

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ СКОПЈЕ
ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА – СКОПЈЕ

Александар М. Додовски

МОЛЕКУЛАРНА И ФИЛОГЕНЕТСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА
ПОЕДИНЕЧНИ ВИРУСИ НА ЊУКАСТЕЛСКАТА БОЛЕСТ
ОТКРИЕНИ ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
- Докторска дисертација -

Ментор

Проф. д-р Иванчо Налетоски

Скопје, 2013 година

Членови на комисијата за одбрана:

Д-р Владимир Савиќ, научен советник

Проф. д-р Славчо Мреношки

Проф. д-р Ристо Проданов

Д-р Дејан Видановиќ, научен соработник

Проф. д-р Дине Митров

Датум на одбрана:

4.7.2013

Датум на промоција:

Научно поле:

Ветеринарна медицина

СОДРЖИНА

БЛАГОДАРНОСТ (ACKNOWLEDGEMENT)

ИЗВАДОК	1
ABSTRACT	2
1. ВОВЕД	3
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА.....	4
2.1. Историја на Њукастелската болест	4
2.1.1. Теории за настанок на Њукастелската болест	5
2.1.2. Панзоотии на Њукастелска болест.....	7
2.1.3. Историја на Њукастелската болест во Република Македонија	8
2.2. Етиологија	12
2.2.1. Таксономија на вирусот	12
2.2.2. Структура на геномот и функции на вирусните протеини ..	15
2.2.3. Репликација на вирусот	18
2.2.4. Еволуција на вирусот	19
2.3. Епизоотологија	24
2.3.1. Извори	24
2.3.2. Патишта на ширење	24
2.3.3. Влезна врата	24
2.3.4. Подложност и диспозиција.....	25
2.3.5. Вируленција и инфекциска доза	29
2.4. Патогенеза	29
2.4.1. Молекуларна основа за вируленција/патогеност	29
2.5. Клиничка слика	31
2.6. Патоанатомски наод	33
2.7. Дијагноза на вирусот на Њукастелската болест	34
2.7.1. Класични методи	34
2.7.2. Молекуларни методи	36
2.7.3. Секвенционирање	40
2.8. Контролни мерки	41

2.8.1.	Дефиниција на Њукастелската болест	41
2.8.2.	Мерки на биосигурност	43
2.8.3.	Вакцинација	43
3.	ЦЕЛ НА ИСПИТУВАЊЕТО	45
4.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА	47
4.1.	Материјал	47
4.1.1.	Вируси на Њукастелската болест	47
4.2.	Методи	53
4.2.1.	Обработка на органи од умрени птици	53
4.2.2.	Изолација на вирусот на Њукастелската болест на ембрионирани кокошкини јајца	54
4.2.3.	Тест на хемаглутинација на алантоисните течности	54
4.2.4.	Тест на инхибиција на хемаглутинација на алантоисните течности	55
4.2.5.	Одредување интрацеребрален патоген индекс	56
4.2.6.	Екстракција на вирусна РНК од алантоисна течност	56
4.2.7.	Екстракција на вирусна РНК од хомогенати од органи	57
4.2.8.	Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време во еден чекор за детекција на матрикс ген	58
4.2.9.	Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време во еден чекор за детекција на фузиски ген	59
4.2.10.	Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во два чекора	59
4.2.11.	Електрофореза на гел	60
4.2.12.	Прочистување на производот од полимеразната верижна реакција од гел	61
4.2.13.	Секвенционирање на производот од полимеразната верижна реакција	62
4.2.14.	Анализа на податоците од секвенционирањето	64
5.	РЕЗУЛТАТИ	65
5.1.	Анамнестички податоци, клнички знаци и патоанатомски наод предизвикани од страна на откриените вируси на Њукастелска болест во Република Македонија	65
5.2.	Резултати од изолација на вирусот на ембрионирани кокошкини јајца	69

5.3.	Резултати од тестот на хемаглутинација на алантоисни течности .	71
5.4.	Резултати од тестот на инхибиција на хемаглутинација на алантоисни течности.....	74
5.5.	Резултати од тестот за одредување интрацеребрален патоген индекс	79
5.6.	Резултати од реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време во еден чекор за детекција на матрикс ген на вирусот на Њукастелската болест	80
5.7.	Резултати од реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време во еден чекор за детекција на фузиски ген на вирусот на Њукастелската болест	84
5.8.	Резултати од реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во два чекора и електрофореза на гел	88
5.9.	Резултати од секвенционирање	92
5.10.	Резултати од филогенетската анализа на вирусите на Њукастелската болест, откриени во Република Македонија	110
6.	ДИСКУСИЈА	116
7.	ЗАКЛУЧОК	130
8.	ЛИСТА НА КРАТЕНКИ.....	132
9.	ЛИТЕРАТУРА	134

БЛАГОДАРНОСТ (ACKNOWLEDGEMENT)

First of all, I would like to express my deepest gratitude to my supervisor Prof. d-r Ivancho Naletoski from Joint FAO/IAEA Division for setting up the research infrastructure used in this thesis, for his devotion in conceptualizing the thesis and for his sincere guidance and leadership during all phases of preparation and finalizing the thesis.

I would like to express my very great appreciation to d-r Vladimir Savic from Croatian Veterinary Institute, Poultry Centre, Zagreb, Croatia for the initial training in all techniques performed in the thesis, for his supervision in preparation of this thesis, for his invaluable advices and for his patience and responsiveness during our everyday communication.

I would like to offer my special thanks to d-r Dejan Vidanovic from Specialized Veterinary Institute Kraljevo, Serbia for his supervision in preparation of this thesis especially for his leadership and advices for the laboratory performance of molecular methods and for his open-handed provision of Serbian sequences.

My special thanks are extended to the Prof. d-r Dine Mitrov from Faculty of Veterinary Medicine - Skopje for his unreserved motivation and support in finalizing the thesis.

I am particularly grateful for the assistance given by my fellow colleagues at the Faculty of Veterinary Medicine – Skopje and the members of the Commission Prof. d-r Slavcho Mrenoshki and Prof. d-r Risto Prodanov who helped me literally in all aspects of the preparation of the thesis. Their impetus influenced the quality of this thesis.

I am grateful for the assistance given by PD Dr. Christian Grund from National Reference Laboratory for Newcastle Disease, FLI-Riems, Germany for his generous help in performing the ICPI test.

I wish to acknowledge the help provided by d-r Ruth Manwell from Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Weybridge UK for supplying monoclonal antibodies used in this thesis.

I would like to thank d-r Gabriela Goujgoulova and d-r Kiril Dimitrov for kindly supplying sequences of Bulgarian isolates used in this thesis.

I would like to acknowledge Joint FAO/IAEA Division and the Technical Cooperation Programme of IAEA for the continuous capacity building and technology transfer in establishing and/or upgrading of the techniques performed in this dissertation.

Part of this thesis is done within the scope of FP6 Project TRANSB_DIS_ANIM_MK “Upgrading and Introduction of Sustainable Diagnostic Tools for the Major Transboundary Disease of Animals in F.Y.R. of Macedonia” coordinated by Prof. Ivancho Naletoski, PhD.

At the very end of this acknowledgement and at the very front of my heart is my family. All words I’d love to write know I’ll keep for them. This dissertation is devoted to them.

ИЗВАДОК

Главна цел на истражувањето беше идентификација и карактеризација на ВЊБ коишто се откриени во Република Македонија, во периодот 2002 – 2012 година. Испитани се 21 сој на ВЊБ, откриени кај домашна живина, гулаби и диви птици. Идентификацијата на соевите е направена со ИХА од класичните методи и со *RT-qPCR* и *RT-PCR* од молекуларните методи. Одредувањето на вируленцијата на соевите е направено со одредување ИЦПИ кај дел од соевите и со одредување на аминокиселинскиот мотив на МР на Ф генот, по пат на секвенционирање. Филогенетската карактеризација на соевите е извршена со порамнување со други соеви од регионот и со референтни соеви на глобално ниво, како и со изработка на филогенетски стебла. Од вкупно испитуваните соеви, 12 припаѓаат на ГПМВ-1, додека девет беа претставници на класичните соеви. Сите испитувани соеви во оваа студија беа вирулентни вируси. Претставниците на ГПМВ-1 припаѓаат на генотипот VIb, додека класичните соеви се претставници на генотипот VIIId и се филогенетски најслични со изолатите од регионот.

Вирусите што се откриени 2002 – 2003 година се едни од првите карактеризирани припадници на генотипот VIIId во Југоисточна Европа. Со голема сигурност може да се каже дека во наведениот период (2002 – 2003), постојат најмалку две рани независни внесувања на вирусите од генотипот VIIId во Македонија, а можеби и порано, како и трето внесување што настанало веројатно подоцна, т.е. во текот на 2005 година.

За епизоотијата на ЊБ (2005 – 2006), одговорни се два различни продори на вирулентни вируси, од коишто вториот продор бил претходно присутен кај живината. Постојаната циркулација на ГПМВ-1 претставува евидентна закана за живината.

Во оваа студија, успешно се имплементирани дијагностички методи во согласност со легислативата на *OIE* и *EU*, но потребно е да се ревидира националната легислатива, имајќи ги предвид дефинициите за ЊБ на *OIE* и *EU*.

Клучни зборови: вирус на Њукастелска болест, секвенционирање, филогенетска карактеризација, Македонија.

ABSTRACT

Main aim of this study was to identify and characterize NDV detected in Republic of Macedonia in the period from 2002-2012. Twenty-one strains of NDV detected in domestic poultry, pigeons and wild birds were examined. Identification of the strains was done with HIT of the classical methods and *RT-qPCR* and *RT-PCR* of the molecular methods. Virulence of the strains was determined with ICPI in the part of the strains and with determination of the amino acid motif of the cleavage site of the fusion gene by sequencing. Phylogenetic characterization of the strains was done with alignment with other strains from the region and with reference strains on a global level and with construction of phylogenetic trees. Of the total 21 strains, 12 strains belong to PPMV-1 and 9 were classical strains. All strains were virulent viruses. Representatives of the PPMV-1 belong to genotype VIb while classical strains belong to genotype VIIId and are phylogenetically related to isolates from the region. Viruses detected in 2002-2003 are one of the first characterized representatives of the genotype VIIId in the Southeast Europe. With a great degree of certainty it can be said that in the designated period there are at least two independent introductions of the viruses of genotype VIIId, possibly even earlier, and a third introduction which occurred probably later i.e. in 2005. Two independent introductions of virulent viruses, one of which was previously present in the poultry were responsible for the epizootics of ND in 2005-2006. Permanent circulation of PPMV-1 was a documented threat to poultry. Diagnostic methods in accordance with OIE and EU legislative are successfully implemented in this study but national legislative should be revised in the context of definition of ND as per OIE and EU.

Keywords: Newcastle disease virus, sequencing, phylogenetic characterization, Macedonia

1. ВОВЕД

Њукастелската болест – ЊБ (*на англ.* Newcastle Disease – ND), е заболување коешто предизвикува огромни економски штети во живинарското производство и придружната индустрија. Заедно со авијарната инфлуенца, претставува најзначајно вирусно заболување кај живината, предизвикувајќи висока смртност. Во руралните средини, каде што претежно се одгледува селска живина којашто претставува значаен извор на храна, ова заболување влијае на квалитетот на животот во тие средини. Во развиената индустрија, кај комерцијалната живина, појавата на ова заболување има силни економски последици поради мерките коишто задолжително се применуваат како нештетно уништување на живината („stamping-out“), забрана за трговија и движење.

Вирусот на Њукастелската болест може да биде присутен, како природен или експериментален домаќин, кај голем број видови птици. Од тогаш до денес, овие бројки се зголемени, при што може да се каже дека огромно мнозинство од видови птици, ако не и сите, подложни се на ова заболување. Интензитетот и карактерот на заболувањето значајно се разликува кај различни видови птици, и може да се појави во изразен клинички облик и висока смртност или без видливи клинички знаци.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

2.1. Историја на Њукастелската болест

Првите регистрирани жаришта на вирулентен облик на ЊБ кај живината се појавуваат во Јава, Индонезија (1926)^[103] и во Њукастел, Англија (1927)^[61]. Ова се извонредни откритија за тоа време, имајќи предвид дека авторите ги направиле овие откритија независно еден од друг, дека тогашните познавања за вирусните заболувања кај живината биле доста оскудни, а особено што во тоа време дополнително била присутна и чумата кај живината (авијарна инфлуенца). Сепак, во литературата постојат податоци за тоа дека ова заболување било присутно и пред 1926 година, како на пример извештаи коишто опишуваат појава на слично заболување кај живината и гулабите во Централна Европа^[72] и на Западните острови во Шкотска, во 1896 година^[119], и двете придружени со нервни знаци и масовни пцовисувања. Исто така, *Levine*^[109], цитирајќи ги *Ochi* и *Hashimoto*, сметал дека болеста била присутна во Кореја, во 1924 година. Болеста го добила името според градот каде што се регистрирани првите жаришта на болеста „Newcastle“, од страна на *Doyle*^[62], како привремено име за да може лесно да се разграничи од другите болести, но до денешен ден, овој термин сè уште е препознатлив можеби како за ниту едно друго заболување.

Подоцна станало јасно дека и поблагите заболувања од првично опишаните вирулентни облици биле предизвикани од ВЊБ. Така во САД, во 1930-тите години е опишано релативно благо респираторно заболување, честопати придружено со нервни знаци и наречено пневмоенцефалитис^[28], за по две години да биде утврдено дека причинител бил вирус којшто со серолошки тестови не можел да се разликува од ВЊБ^[29].

Со текот на времето, изолирани се бројни вируси на ЊБ кај живината, коишто се манифестирале со мошне благи симптоми или пак не предизвикувале никакви симптоми [25, 78].

2.1.1. Теории за настанок на Њукастелската болест

Hanson [73, 74], врз основа на претходните истражувања, изнел три теории за настанок на вирулентните соеви на ВЊБ:

1. Вирусот отсекогаш бил присутен кај живината, но не бил забележан до развојот на комерцијалната живинарска индустрија;
2. Вирулентниот вирус се наоѓал во ензоотски облик кај други видови птици, кај коишто предизвикувал благо заболување или инапарентна инфекција;
3. Вирулентниот вирус настанал со мутација од авирулентен вирус.

Првата теорија се сметала за невозможна, поради тоа што и денес во големи делови на светот има редовна појава на широко распространети жаришта на ЊБ кај селската живина, коишто се манифестираат со висока смртност, со што се избегнува можноста вирусот да поминал незабележано. Во прво време, за возможна се сметала втората теорија поради сознанијата добиени за време на панзоотијата 1970 – 1973 година, кога вирусот е внесен на нови географски подрачја (САД, Калифорнија) со трговијата на т.н. 'кафезни' птици, особено од редот *psittaciformes*, коишто поседувале одредена отпорност кон соевите што биле високо вирулентни за живината. Од друга страна пак, во научната литература, освен за кормораните во Северна Америка и веројатно за гулабите недостасуваат докази дека дивите птици се резервоари на вирулентни соеви на ВЊБ. По спроведените истражувања на жариштата на вирулентна ЊБ во Ирска (1990 год.) и во Австралија (1998 – 2000), утврдено е дека третата теорија е научно исправна [16]. Имено, со филогенетски истражувања е докажано дека во случајот на Ирска, овие вируси се мошне сродни со авирулетните вируси изолирани од водени птици (слика 2.1.) [49], додека во случајот на Австралија, овие вируси се сродни со нисковирулентните вируси, изолирани од кокошки од истото географско подрачје.

Во вториот случај, доволна била само мутација на две места на местото на расекување на *F0* протеинот, за вирусот да стане вирулентен (слика 2.2.) [71].

Табела 2.1. Нуклеотидна/аминокиселинска секвенција на местото на расекување на F0 кај високовирулентен вирус [34/90], изолиран од живина во Ирска, споредена со антигенетски и генетски сроден вирус со ниска вируленција, изолиран од патки^[49].

Вирус	Вируленција	Нуклеотидна/аминокиселинска секвенција на местото на расекување на Ф0
MC110	ниска	GAA CGG CAG GAG CGT CTG
		¹¹² ERQER*L ¹¹⁷
34/90	висока	<u>AAA</u> CGG CAG <u>AAG</u> CGT <u>TTT</u>
		¹¹² KRQKR*F ¹¹⁷

Табела 2.2. Нуклеотидна/аминокиселинска секвенција на местото на расекување на Ф0 кај високо и нисковирулентен вирус, изолиран во Австралија во 1998^[184].

Вирус	Вируленција	Нуклеотидна/аминокиселинска секвенција на местото на расекување на Ф0
1154/98	ниска	GGA AGG AGA CAG GGG CGT CTT
		¹¹¹ GRRQGR*L ¹¹⁷
1238/98	висока	GGA AGG AGA CAG <u>AGG</u> CGT <u>TTT</u>
		¹¹¹ GRRQRR*F ¹¹⁷
1249/98	висока	GGA AGG AGA CAG <u>AGG</u> CGT <u>TTT</u>
		¹¹¹ GRRQRR*F ¹¹⁷

Недостатокот од изолација на вирулентни вируси од дивите птици, укажува на фактот дека мутациите од нисковирулентни во високовирулентни вируси веројатно се случуваат откако вирусот ќе биде внесен кај живината. Во вакви услови, дополнителен предизвик претставува и масовната употребата на вакцини базирани на живи не-вирулентни вируси низ целиот свет^[16]. Од друга страна, резултатите од студијата на Miller et al.^[124] укажуваат дека местото на расекување на Ф протеинот кај предците вируси е конзервирано, и дека се потребни извонредни околности за да настане мутација од нисковирулентен во високовирулентен вирус. Во прилог на оваа хипотеза се стабилноста на живите вакцини (La Sota и B1) што се користат преку 40 години и недостатокот на докази за способноста на вирулентен вирус да се преобрази во авирулентен вирус. Преваленцијата на негативната селекција на Ф протеинот со ниската стапка на мутации укажуваат дека е тешко вирулентен вирус да настане од авирулентен вирус^[124]. Овие заклучоци, Miller et al.^[124] ги темели врз основа на анализа на рекомбинацијата, анализа на адаптивната еволуција, анализа на синонимната и несинонимната мутација, еволутивната анализа на протеините на ВЊБ и стапката на

промена на протеините на ВЊБ, со помош на комерцијални компјутерски програми и сложени статистички модели на 1238 секвенци на делот на Φ генот што го опфаќа МР.

2.1.2. Панзоотии на Њукастелска болест

Според Alexander^[7], од првото откритие на ЊБ до денес, во светски рамки се појавиле четири панзоотии.

Првата панзоотија настанала во 1920-тите години во југоисточна Азија, и траела сè до 1950-тите години. Првично се развивала доста бавно, а по 16 години се раширила во панзоотски размери^[73]. Со примената на масовни вакцинации, ширењето на панзоотијата било ставено под контрола, по што таа исчезнала.

Втората панзоотија почнала во 1960-тите години на Блискиот Исток, и нејзе ѝ биле потребни само 4 години за да добие панзоотски размери^[73]. Како причини за брзото ширење на оваа панзоотија се наведуваат сè поголемиот замав на индустриското живинарско производство, трговијата со живи птици и развојот на воздушниот транспорт. Од друга страна, некои автори ја доведуваат оваа панзоотија во врска со трговијата на птици што се чуваат во кафези (*psittaciformes*) од Јужна Америка во САД и Европа^[65, 181].

Врз основа на антигенетските и генетските докази што ги изнеле во своите испитувања, Alexander et al.^[19] и Lomniczi et al.^[116] укажуваат дека во доцните 1970-ти години се појавува и трета панзоотија. Почетокот и ширењето на оваа панзоотија не се прецизирани, поради универзалната употреба на вакцините од средината на 1970-тите години, со што птиците можат да го шират вирусот без притоа да имаат клиничко манифестирано заболување.

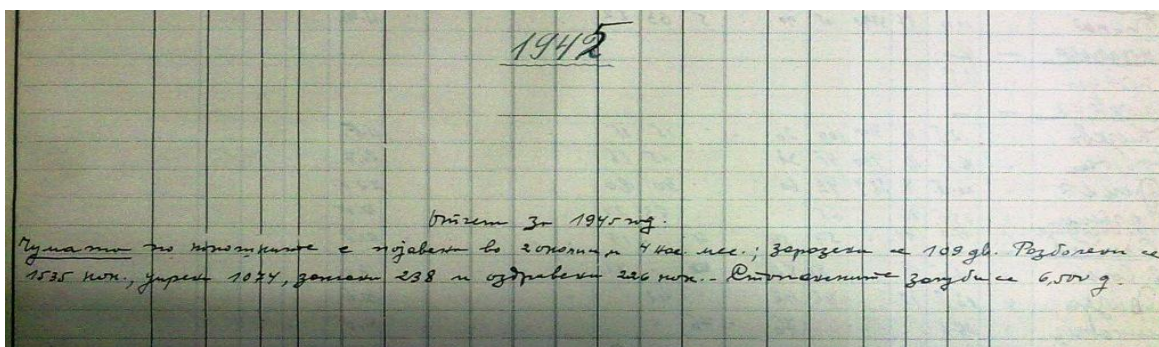
Појавата на четвртата панзоотија е во средината на 1980-тите години, првенствено кај гулабите, иако е забележан и пренос на болеста и кај живината. Првите почетоци на оваа панзоотија можеби датираат од крајот на 1970-тите години на Блискиот Исток^[92], додека првите случаи во Европа се забележуваат во 1981 година^[33]. Во 1984 година, панзоотијата зема голем замав кај популацијата на гулаби и од нив се шири кај живината, па така во Велика Британија се појавуваат жаришта на ЊБ кај живината, предизвикани од храна за живина, контаминирана со фекалии од гулаби^[21]. Оваа панзоотија сè уште трае и

веќе има ензоотски карактер кај гулабите, со што претставува постојан извор на зараза за живината и дивите птици.

2.1.3. Историја на Њукастелската болест во Република Македонија

Не постојат прецизни податоци за влезот на ЊБ во Република Македонија, но врз основа на првиот опис на болеста на подрачјето на Југославија од страна на *Hirbauer* и *Topolnik* ^[88], во местото Савски Мароф во близина на Загреб, Хрватска (1941 година), се претпоставува дека е за време на Втората светска војна.

Првиот регистриран случај во Македонија е на 6.5.1945 година во Скопје ^[196]. Непосредно по појавувањето во Македонија, болеста ги опфатила сите краевии при што нанела големи загуби во живинарството ^[195, 196, 199].



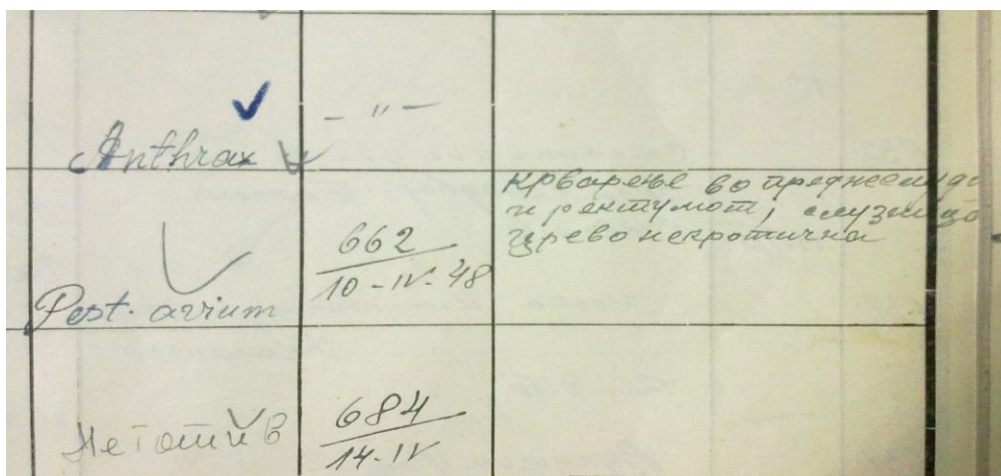
Слика 2.1. Извадок од Книга на епизоотии при Министерството за земјоделие на НР Македонија, со следниов текст: Отчет за 1945 год. Чумата по кокошките е појавена во 2 околии и 4 нас. мес.; заразени се 109 дв., разболени се 1535 кок., умрени 1074, заклани 238 и оздравени 226 кок. Стопанските загуби се 6.500 д. (со дозвола од Македонска ветеринарна комора).

Во 1949 година, прв пат се применува вакцина во борбата против ова заболување и тоа вакцина подготвена од сојот *Mukteshwar*, но без поголем успех. Како причини се наведуваат слабите имуногени својства на вакцината, некомплетната вакцинација, слабата примена на ветеринарно-санитарните мерки, непријавувањето на заразата и слободното чување на кокошките. Треба да се има предвид дека во тој период, живинарството во Македонија е исклучиво од екстензивен карактер.

Во 1952 година се применува нова серија на вакцината *Mukteshwar*, овој пат со подобри резултати поради подобрената имуногеност на вакцината и поголемиот број вакцинирани кокошки, што во 1954 година достигнал околу 50% од вкупниот број

кокошки во земјата ^[199]. Покрај вакцината *Mukteshwar*, во 1976 година се воведува и вакцина произведена од сојот *La Sota*, со којашто се врши вакцинација 2 пати годишно. Веќе од 1982 година се врши вакцинација исклучиво со сојот *La Sota*.

Од појавувањето, па до крајот на осумдесеттите години од минатиот век, болеста редовно се појавува секоја година ^[199, 200, 201, 202] и тоа во зимските месеци ^[196]. Едно од поизразените избивања на ЊБ се забележува во живинарската фарма Белимбегово во 1963 година, каде што пцовисуваат 20.000 единки ^[200]. Во прилог на ова одат и научните трудови објавени во минатиот период, коишто претежно се занимаваат со контролата, сузбивањето, начинот на вакцинација, имуногеноста, но не и со директно или индиректно докажување на причинителот ^[117, 118, 131, 197].



Слика 2.2. Извадок од лабораториска книга на Ветеринарниот институт, 1948 година. Текст: *Pest. avium*; крвавење во преджелудник и ректум, слузница црвено некротична

Последна епизоотија од поголеми размери е забележана во периодот од септември 2005 до мај 2006 година, претежно кај селската живина низ целата територија на Македонија, но тогаш не е извршена молекуларна и филогенетска карактеризација на вирусот ^[57]. Всушност, во 2005 година е доставено до *OIE* итно Известување од страна на Управата за ветеринарство при МЗШВ, во коешто се известува за појава на Њукастелската болест во селото Могила, Битола ^[83], коешто е и последно до денес. Претходно, во рамките на годишните извештаи за состојбата на болестите кај животните во Македонија, испраќани до *OIE*, од 1996 година до 2004 година се известува за појава на Њукастелската болест секоја година од 1999 до 2004 година, со вкупно 32 жаришта ^[80].

Табела 2.3. Повеќегодишна состојба на болести кај животните / ЊБ во Република Македонија ^[80]

Година	Појавување	Вид	Број на		
			жаришта	случаи	пцовисувања
1996	-	avi			
1997	-	avi			
1998	-				
1999	+	avi
2000	+	avi	15
2001	+	avi	4
2002	+	avi	2
2003	+	avi	9
2004	+	avi	2

Од друга страна, од табелата 2.3. може да се види бројот и времетраењето на пријавените жаришта до *OIE*, од страна на земјите кои се во непосредна близина на Македонија. Од податоците во табелата може да се заклучи дека епизоотијата на ЊБ во Македонија, во периодот 2005 – 2006 година е во рамките на генералната слика за појавата и ширењето на ЊБ во регионот, за наведениот период.

Табела 2.4. Пријавени жаришта на Њукастелската болест во земјите од регионот до ОИЕ, од 2005 година до 2013 година ^[82]

2005			
Земја	Датум на известување	Жаришта	Датум на завршеток
Бугарија	23.8.2005	1	23.8.2005
Грција	8.1.2005	1	11.2.2005
Грција	6.4.2005	2	9.6.2005
Грција	7.6.2005	3	19.8.2005
Грција	9.11.2005	1	7.12.2005
Романија	22.11.2005	144	15.6.2006
2006			
Бугарија	25.1.2006	20	27.3.2008
Романија	2.11.2006	29	20.7.2007
Србија и Црна Гора	6.12.2006	3	1.2.2007
2007			
Грција	2.11.2007	1	6.12.2007
Романија	2.11.2007	1	3.12.2007
Романија	6.9.2007	3	29.10.2007
Србија	25.4.2007	8	25.7.2007
2008			
Бугарија	21.11.2008	1	17.3.2009
Романија	4.2.2008	1	28.2.2008
Романија	6.3.2008	1	7.4.2008
2009			
Бугарија	14.5.2009	6	15.9.2009
Хрватска	11.5.2009	1	13.7.2009
2012			
Романија	12.10.2012	1	13.11.2012
2013			
Бугарија	25.1.2013	1	24.1.2013

2.2. Етиологија

Со помош на електронска микроскопија со негативен контраст, утврдено е дека вирусната честичка поседува плеоморфен облик со големина 100 – 500 nm во дијаметар, иако честопати може да се сретнат и филаментозни облици со големина од 100 nm. Површината на вирусот е покриена со изданоци во должина од 8 nm. Едносинцирестата РНК има молекулска тежина од 5×10^6 , што претставува 0,5% од тежината на вирусната честичка^[101].

2.2.1. Таксономија на вирусот

Вирусот на Њукастелската болест спаѓа во редот *Mononegavirales*, фамилија *Paramyxoviridae*, потфамилија *Paramyxovirinae*, род *Avulavirus*. Во големата фамилија на *Paramyxoviridae* спаѓаат некои од најзначајните вируси за луѓето и животните, како што се: вирусот на сипаници, вирусот на заушки, вирусот на 'штенечак', параинфлуенца вирусите, респираторниот синцитијален вирус, хендра вирусот, нипах вирусот, метапневмовирусите и веќе искоренетиот вирус на чума кај говедата^[81].

Претходно, ВЊБ бил групиран во родот *Rubulavirus*, но по истражувањата на *de Leeuw* и *Peeters*^[56] кои го секвенционирале целиот геном на ВЊБ сој *La Sota* и на *Seal et al.*^[155], тој е сместен во родот *Avulavirus*^[121].

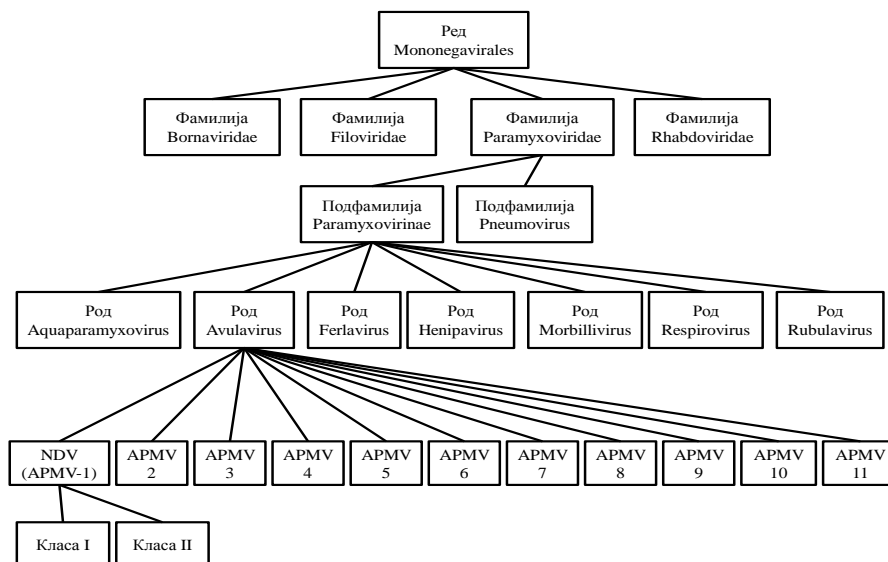
Во родот *Avulavirus*, до скоро беа познати 9 серотипови на парамиксовирусите, означени како АПМВ-1 до АПМВ-9. Но, неодамна оваа листа е зголемена за уште 2 претставника и тоа, АПМВ-10 откриен кај пингвини (*Eudyptes chrysocome*) на Фолкландските Острови^[125] и АПМВ-11 откриен кај барска шлука (*Gallinago gallinago*)^[36].

Денес, во научната и стручната литература, термините ВЊБ и АПМВ-1 се употребуваат како синоними, иако за да се разликуваат варијантните соеви на АПМВ-1, одговорни за сè уште тековната панзоотија кај тркачките и другите видови гулаби, се користи терминот гулабов парамиксовирус тип 1 – ГПМВ-1 (на англ. Pigeon Paramyxovirus Type 1 – PPMV-1)^[13].

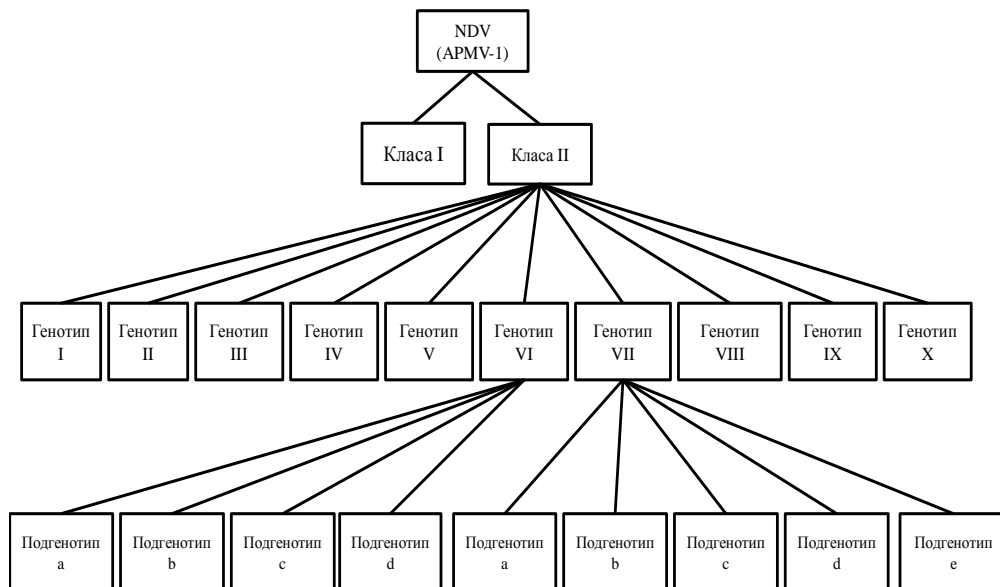
Meѓу ВЊБ постои голема генетска варијабилност, па поради тоа, тие дополнително се поделени на неколку генотипови / генетски лози. Денес се користат две различни класификации на ВЊБ, врз основа на генетски анализи. Првата класификација е од *Ballagy-Prodany et al.* ^[26], кои користејќи техника со рестриktivни ензими утврдиле 6 различни генотипови, означени од I до VI. Со помош на секвенционирање на дел од Ф генот (*на англ.* fusion gene), *Lomniczi et al.* ^[116] ги потврдиле генотиповите идентификувани од *Ballagy-Prodany et al.* ^[26], така што денес со помош на оваа техника се идентификувани 10 генотипови на ВЊБ, означени од I до X. Втората класификација е од *Aldous et al.* ^[5], кои проучувајќи го делот на Ф генот во должина од 375 нуклеотиди, којшто го опфаќа и местото на расекување – МР (*на англ.* cleavage site) на Ф генот, ги поделиле ЊБ вирусите на 6 лози (означени од 1 до 6), од коишто секоја од лозите 3 и 4 се поделени уште на 4 подлози (од а до d), а лозата 5 е поделена на 5 подлози (од а до е). Подоцна, *Czegledi et al.* ^[53] ќе утврдат дека ЊБ вирусите се поделени на 2 класи, класа I и класа II, при што класата I кореспондира со лозата 6, идентификувана од *Aldous et al.* ^[5], и е со големина на геномот од 15.198 нуклеотиди, додека класата II е со големина на геномот од 15.186 нуклеотиди и тука припаѓаат генотиповите од I до IV, коишто се рани генотипови на ВЊБ, т.е. пред 1960 година. Овие 2 групи на вируси еволутивно се постари и веројатно потекнуваат од примордијален резервоар кај водните птици. Вирусите на ЊБ од класата I дополнително се делат на 9 генотипови, досега се изолирани од диви водни птици и домашна живина и претежно се авирулентни вируси ^[8, 53, 98]. Во класата II спаѓаат претежно вирулентните вируси, но има и авирулентни вируси. Во рамките на класата II, подоцна (по 1960 година) се јавува поголема група на вируси со големина на геном од 15.192 нуклеотиди, настанати со инсерција на 6 нуклеотиди во некодирачкиот регион на нуклеопротеинскиот ген, и тука се сместени генотиповите од V до X ^[53, 56, 87, 175]. Вирусите од генотипот I се претставници на авирулентни соеви од водните диви птици и живината од целиот свет; во генотипот II спаѓаат изолатите од Северна Америка; во генотиповите III и IV спаѓаат раните изолати од Далечниот Исток и Европа, причинители на првата пандемија од средината на 1920-тите години до 1950-тите години; во генотиповите V и VI припаѓаат изолатите од втората пандемија во 1960-тите и 1970-тите години; вирусите од генотипот VIb се одговорни за третата пандемија во 1980-тите години и водат потекло од гулабите; припадниците на генотиповите VII и VIII се предизвикувачи на последната

пандемија и се појавени на крајот на 1980-тите години на Далечниот Исток ^[75, 115, 116] и од таму се шират во Европа и Јужна Америка; додека изолатите од генотипот IX, изолирани од 1946 до 2002, филогенетски потекнуваат од геногрупата III, но според големината на геномот се исти со генотиповите од V до VIII, што веројатно значи дека последниве потекнуваат од геногрупата IX ^[145].

Miller et al. ^[126] ги изнесуваат проблемите со сегашните две класификации на ВЊБ, така што вршеле пресметка на просечната еволутивна дивергенција меѓу генотиповите и утврдиле дека разликите меѓу подгенотиповите во рамките на генотипот VI се поголеми отколку разликата помеѓу генотиповите III и IV, што укажува на тоа дека генотипот VI треба дополнително да се подели на нови генотипови. Поради ова, предложуваат научна конференција за поставување објективни стандарди за создавање широко призната и постојана класификација.



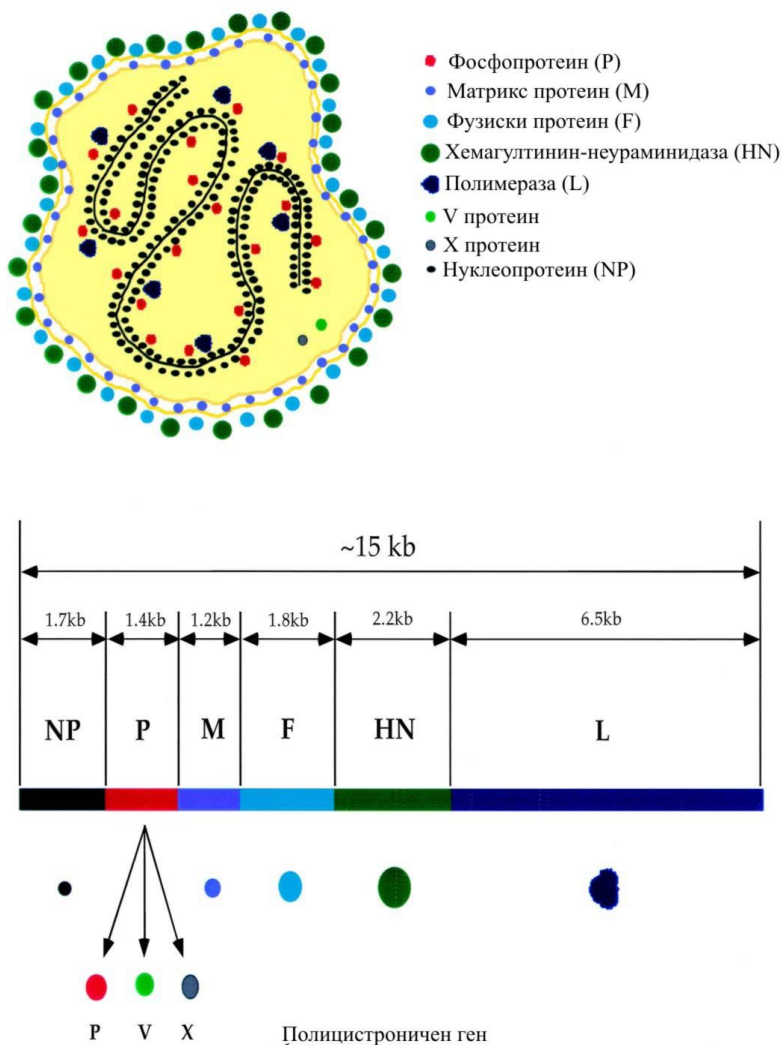
Слика 2.3. Шематски приказ на таксономската припадност на ВЊБ



Слика 2.4. Шематски приказ на генотиповите на ВЊБ во рамките на вирусите од класа II и подгенотиповите на генотиповите VI и VII

2.2.2. Структура на геномот и функции на вирусните протеини

Вирусите на ЊБ поседуваат несегментирана едносинциреста континуирана РНК со негативен правец. Тие се племорфни со големина на геномот од 15.186, 15.192 или 15.198 нуклеотиди, којшто содржи 6 гени во правец 3' – NP – P – M – F – HN – L – 5', коишто пак енкодираат 6 вирусни протеини (нуклеопротеин, фосфопротеин, матрикс протеин, фузиски протеин, хемаглутинаин-неураминидаза и полимераза протеин). Постојат и 2 дополнителни протеини V и W, експресирани од иРНК, а коишто се добиваат од P генот преку обработка на РНК [166]. Геномот на ВЊБ во вирусната честичка е присутен во форма на РНП комплекс, додека голата вирусна РНК е неинфективна. Овој комплекс е составен од нуклеокапсидно јадро и P и L протеините, и претставува шаблон за транскрипција од страна на L протеинот (РНК зависна РНК полимераза). L протеинот се врзува за геномската РНК на 3' крајот на РНП комплексот и врши транскрипција на шест протеини преку старт-стоп механизмот, т.е. L протеинот ја започнува транскрипцијата и го ослободува РНП комплексот по транскрипција на шест нуклеотиди, односно НП поединицата мора да е во контакт со шест нуклеотиди истовремено. Овој механизам е познат под името „правило на шестката“ (на англ. “rule of six”) и е карактеристичен за фамилијата *Paramyxoviridae* [140].



Слика 2.7. Структура и геномска организација на вирусот на Њукастелската болест. ВЊБ е вирус со обвивка со два површински гликопротеини, фузиски (Ф) и хемагултинин-неураминидаза (HN). Матрикс (M) протеинот е 'јукста' позициониран помеѓу обвивката и внатрешноста на нуклеокапсидната структура. Нуклеопротеинот (N), фосфопротеинот (P) и полимерата (L) протеинот го сочинуваат транскриптазниот комплекс и се во близок контакт со вирусниот геном. Геномот на ВЊБ едноинциреста РНК, поставена во негативен правец, којашто кодира шест отворени рамки за читање (на англ. open reading frames). Протеинот P е полицистроничен поради вметнувањето на барем еден дополнителен гванозин за време на транскрипцијата и искористувањето на потенцијалните алтернативни места за транскрипција^[157].

Хемаглутинаин-неураминидаза протеин

Овој протеин претставува гликопротеин тип 2, тетрамер што е вкотвен во мембраната преку хидрофобен трансмембрански домен од околу 25 аминокиселини, лоциран близу до amino-крајот. Кај некои соеви на ВЊБ, тој се состои од два димера, поврзани со дисулфидни врски^[107]. Врз основа на анализата на неговата примарна секвенција, тој структурно е сличен со неураминидаза (NA) гликопротеинот на инфлуенца вирусот, поседувајќи глобуларна глава поставена врз делот којшто се врзува за мембраната^[52]. Овој протеин поседува 3 различни функции: врзувачка/прилепувачка (се врзува за клеточните рецептори), неураминидазна (ослободување на новите вирусни честички или одлепување на вирусот) и промотивна фузиска (помага во фузијата на мембраните на вирусот и клетката) дејност. Тој поседува две различни рецепторски места за врзување со рецепторите коишто содржат сијалинска киселина, од коишто едното е одговорно за прилепување на вирусот за мембраната, а другото е одговорно за уништување на првиот рецептор и ослободување на новите вирусни честички од инфицираната клетка^[106]. Овој протеин има улога во промоција на фузијата којашто е вирусно специфична, веројатно преку коекспресија помеѓу него и Ф протеинот, со цел да настане фузија на вирусот со клетката домаќин^[85, 106, 160]. Исто така, ХН протеинот има улога и во одредувањето на тропизмот на вирусот кон ткивата, независно од аминокиселинската секвенција на Ф протеинот^[87].

Фузиски протеин

Синтезата на Ф протеинот започнува по должина на ендоплазматскиот ретикулум како инактивен Ф0 прекурсор. За да се активира Ф протеинот, Ф0 мора да биде расечен на Ф2 и Ф1 полипептиди за да се активира инфективноста на новосоздадените вирусни честички. Овие полипептиди мора да останат врзани за површината на вирусот со дисулфидни врски, за вирусните честички да бидат инфективни. Двата хидрофобни региони на Ф1 полипептидот се фузиски пептид на N-крајот и трансмембрански дел. Ф1 полипептидот содржи два хептадни хидрофобни региони, означени како HRA и HRB. По почетната транслација, а пред почетокот на фузијата, Ф протеинот се завива во

метастабилна форма. По неговата активација започнуваат големи конформациски промени. Овие промени го намалуваат 'градиентот' на енергија, така што се формира стабилна постфузиска конформација. Активираниот Ф1 полипептид учествува во фузијата помеѓу липидната мембрана на вирусот и клеточната мембрана на домаќинот. Фузијата на мембраните му овозможува на вирусниот геном да навлезе во клетката домаќин и да започне процесот на репликација / размножување^[34, 108]. Улогата на Ф протеинот во вируленцијата/патогеноста и во репликацијата на вирусот се опишани во поглавјата 2.4.1. и 2.2.3., соодветно.

Останати протеини

Матрикс протеинот има важна улога во составувањето на вирусот преку интеракција со нуклеопротеинот, липидната мембрана и деловите на гликопротеините, коишто се изложени на внатрешната страна од мембраната. Тој, сепак не содржи доволно долги хидрофобни региони, коишто би ја опфатиле целата должина на липидната мембрана^[194].

Другите протеини (NP, P и L) имаат улога во репликацијата и инфективноста на вирусот. НП протеинот е место каде што се одвива синтеза на вирусната РНК и тој ја опфаќа геномската РНК во нуклеокапсид за време на репликацијата, за да ја заштити од деградација. Концентрацијата на слободниот НП протеин во клетката служи за ограничување на стапката на транскрипција и репликација. P и L протеините се наоѓаат во нуклеокапсидот и се потребни за активноста на полимеразата. P протеинот е вклучен во составувањето на ланецот и го врзува L протеинот со РНК, поврзана со НП така што се формира РНП комплексот. Вирусната репликација се заснова на сите три протеини за да може да настанат инфективни вирусни честички^[77].

2.2.3. Репликација на вирусот

Репликацијата на вирусот започнува со присоединување на вирусот со клеточната мембрана на домаќинот, на тој начин што ХН протеинот се врзува за сијалинските рецептори коишто се наоѓаат на површината на мембраната, доближувајќи го Ф протеинот

до клетката домаќин. За време на фузијата, Ф1 полипептидот поминува низ конформациски промени, така што ги изложува двата хидрофобни региони HRA и HRB коишто ја врзуваат вирусната мембрана со мембраната на клетката домаќин, што резултира со создавање пора преку којашто вирусниот нуклеокапсиден комплекс навлегува во клетката домаќин^[34, 108, 128]. За време на фузијата, М протеинот се одвојува од нуклеокапсидниот комплекс и на тој начин го ослободува нуклеокапсидот во цитоплазмата. Сите процеси што се врзани за репликацијата се случуваат во цитоплазмата на клетката домаќин. Поради тоа што геномот на вирусот е РНК насочена во негативен правец, потребно е полимеразата да навлезе во клетката заедно со геномската РНК за да започне транскрипцијата. За време на овој процес се формира преодна РНК, насочена во позитивен правец, којашто служи како иРНК и ги користи ресурсите на домаќинот за да изврши транслација на протеини. Освен Ф и ХН коишто се создаваат во ендоплазматскиот ретикулум, сите други протеини се создаваат во цитоплазмата. Вирусните протеини се транспортираат до клеточната мембрана, каде што се формира новата вирусна честичка преку модификација на клеточната мембрана. Протеините од нуклеокапсидот се порамнуваат со новата мембрана и така настанува РНП комплексот. Новите вирусни честички се ослободуваат преку мембраната на домаќинот со пупење. За време на составувањето на вирусот, вирусните гликопротеини се експресираат на површината на клеточната мембрана, и во услови на нивна акумулација на површината доаѓа до формирање синциција преку фузија на соседните клетки. Ф протеинот е способен да формира синциција и без помош на ХН протеинот^[34, 128, 173].

2.2.4. Еволуција на вирусот

Miller et al.^[126] наведуваат три фактора коишто го зголемуваат ризикот од појава на жариште, и поради коишто е потребно да се проучат еволутивните механизми што влијаат на геномот на вирусот: 1) доволни се промени во само неколку нуклеотиди во Ф генот, за вирусот да премине од нисковирулентен во високовирулентен; 2) постојат многу и високо подвижни резервоари на нисковирулентни вируси во природата, коишто можат да дојдат во контакт со живината; и 3) милијарди дози на нисковирулентни вакцинални вируси се инокулираат во живината на годишно ниво, ослободувајќи ја вакцината во околината. Со

цел превентивно да се спречи болеста, би било идеално ако може да се предвиди потенцијалот на секој генотип да мутира од вирус со ниска вируленција во вирус со висока вируленција.

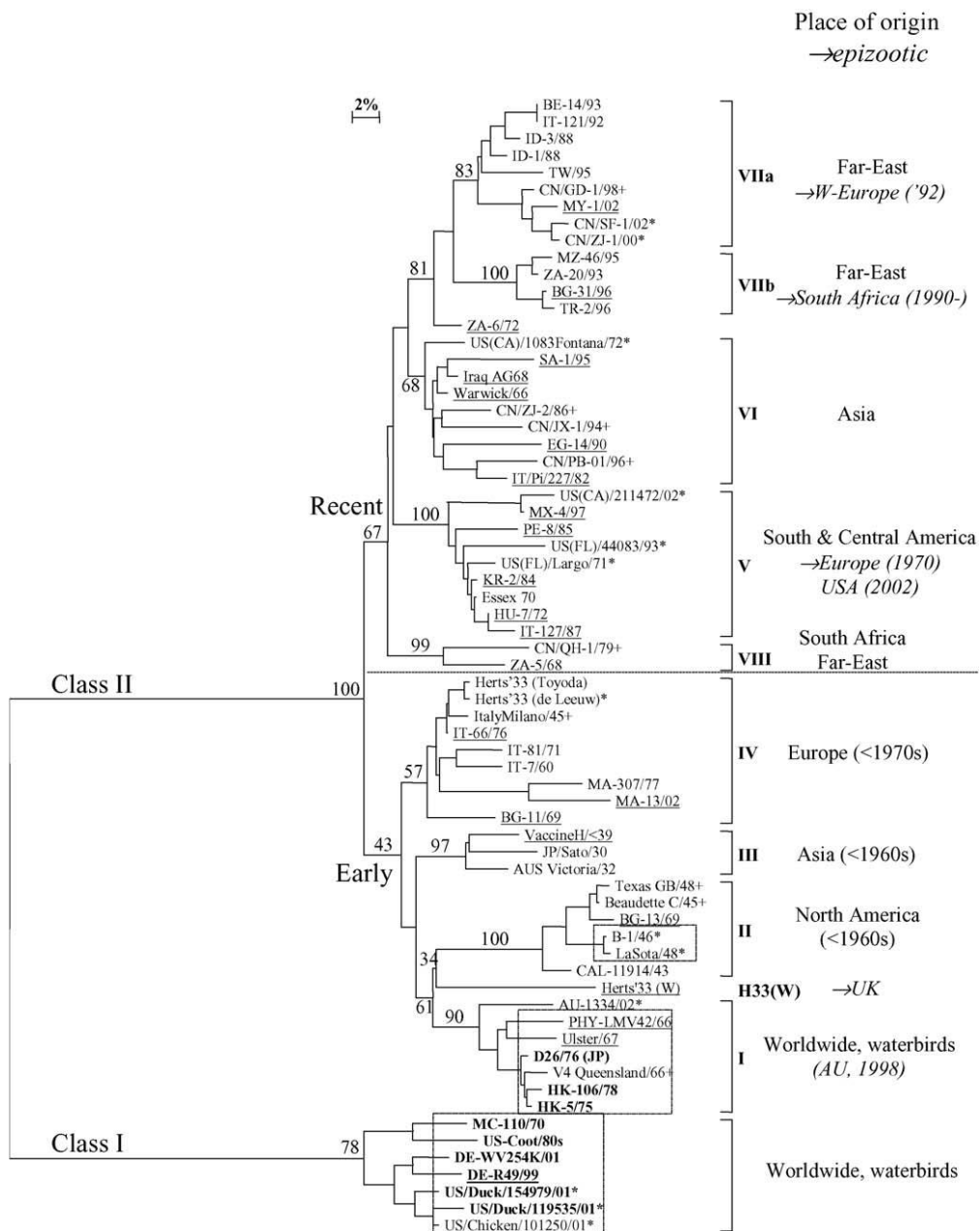
Врз основа на анализа на молекуларните и филогенетските карактеристики на комплетните геномски секвенци на 15 репрезентативни соеви од класите I и II, на целиот L ген на 28 репрезентативни соеви од класите I и II, на местото на расекување на Ф генот (nt 47 – 420) на 67 репрезентативни соеви од класите I и II и на 5'NCR, регионот на НП генот на 35 репрезентативни соеви од класите I и II, *Czegledi et al.* ^[53] ги извлекуваат следните заклучоци за еволуцијата на вирусите на Њукастелската болест. Филогенетските анализи на постоечките ВЊБ соеви откриваат дека во историјата на *AMPV-1* се случиле две големи поделби што довело до формирање три класи со различна големина на геномот. Секоја од овие класи поседува различни карактеристики. Дамнешната поделба настанала во примордијалниот резервоар, на тој начин што настанале две сестрински класи, класа I и класа II, најверојатно уште пред да настанат патогените вируси. Се претпоставува дека животните карактеристики на постоечките апатогени вируси одговараат на дамнешните вируси. Изнесени се неколку аргументи во прилог на настанувањето на дамнешната поделба: извонредно високата генетска разлика (~35% кај Ф генот) помеѓу овие класи одговара на многу подолг нивен престој во примарниот домаќин отколку на генотиповите од I до VIII во секундарниот домаќин (живината); кај двете високодивергентни авирулентни лози (класа I и генотип I од класа II) недостасува инсерција од шест нуклеотиди во 5'NCR регионот на НП генот (што е карактеристика за неодамнешните епизоотски вируси кај кокошките) (слика 2.5.); покрај тоа што се разликуваат во мноштво аминокиселински измени, тие најверојатно се разликуваат и во инсерција – бришење на четири аминокиселини во Р генот. Другата голема поделба се случила во 20 век кај секундарниот домаќин, при што од раните генотипови од I до IV настануваат неодамнешните генотипови од V до VIII, преку инсерција на шест нуклеотиди во 5'NCR регионот на НП генот.

1620	1630	1640	1650	1660	1670	
GATCATCCCAATTCCTCCGCCCACAC	-----	CCCACCCCTCAATCCGCAAT				AU-1108/01
GATCATCCCAATTCCTCCGCCCACAC	-----	CCCACCCCTCAATCCGCAAT				AU-1334/02
AATCATCCCAATTCCTGCTCGCAC	-----	CCCACCTCTCAATCCGCAAGT				PHY-LMV42
AACCATCCCAACCCCTTCGGTCTGCAC	-----	CTCACCCCAATCCGCAAT				I-2.seq
AATCATCCCAATATCCTCACCCGTAG	-----	TCGACCCCTCGATTTGCGGC				AQI-ND026
AAACATCCCAATGCCCTCACCCGTAG	-----	TCGACCCCTCGATTTGCGGC				LaSota/46
AAACATCCCAATGCCCTCACCCGTAG	-----	TCGACCCCTCGATTTGCGGC				Clone-30
GAACATCCCAATGCTCTCACCCGTAG	-----	TCGACCCCTCGATTTGCGGC				B1/46
GAACATCCCAATGCTCTCACCCGTAG	-----	TCGACCCCTCGATTTGCGGC				VG-GA
AATCATCTCGATTCCTTCTGCCTGTAA	-----	CCTAACCCCTGGTCCACAGT				Mukteswar
AATCATCTCGATTCCTTCTGCCTGTAA	-----	CCTAACCCCTGGTCCACAGT				JS/7/05/Ch
AATCATCTCGATTCCTTCTGCCTGTAA	-----	CCTAACCCCTGGTCCACAGT				JS/9/05/Go
GACCACCCCAACCCCTCTGCCCGCAC	-----	CCCACCCCTGATCCGCAGC				Herts/33
GACCACCCCAACCCCTCTGCCCGCAC	-----	CCCACCCCTGATCCGCAGC				Italien
GACCATCCCAACCCCTCGCACGCAC	CCCCC	CCCACCCCTGATCCGCAGC				F48E8
GACCATCCCAACCCCTCGCACGCAC	CCCCC	CCCACCCCTGATCCGCAGC				ZJ/1/86/Ch
GACCATCCCAACCCCTCGCACGCAC	CCCCC	CCCACCCCTGATCCGCAGC				FJ/1/85/Ch
GACCATCCCAACCCCTCGCACGCAC	CCCCC	CCCACCCCTGATCCGCAGC				JS/1/97/Ch
GACCATCCCAACCCCTCGCACGCAC	CCCCC	CCCACCCCTGATCCGCAGC				JS/1/02/Du
AATCGCCCAAAATCCCCGCCAAAC	CCCCC	CCTCCCTCGGCCACAGC				US(FL)/44083/93
GGCCACCCCAAAATCCCCGCCGAAC	CCCCC	CTCACTCCCCGACCCACAGC				US(CA)/211472/02
GGTCGCCCAAAATCCTCCGCCCGAAC	CCCCC	CTCACTCCCCGACCCACAGC				US(FL)/Largo/71
GGCTATCCCAAAATCCTCCGTCTGACC	CCCCC	CCCACCCCTGACCCACAGC				QH1
GGCTATCCCAAAATCCTCCGTCTGACC	CCCCC	CCCACCCCTGACCCACAGC				QH4
GGTCAGCCCAAAACCTTTCCGCCGAAC	CCTCC	CAAACTCCCCGACTCACTGC				IT-227/82
GGTCATCCCAAAACCCCTCCGCCGAAT	CTCTC	CAAACTCCCCGATTCACAGC				US(CA)/1083Fontana/72
GGCCATCCCAAAATCCTCCGCCGAAC	CCTCCA	AAAAATCCCCGACCCACCGG				dove/Italy/2736/00
AGTCACACCAAAACCCCTCCGCCAAAA	CCCTCC	CACACTCCCCGACCCACAAC				CN/ZJ-1/00
GACCACACCAAAACCCCGCCAAAAA	CTCTCC	CACACTCCCCGACCCACAAC				NA-1
GATCATGTCAAACCTCTCCGCCAAAA	CCCTCC	CACACCCCTGACCCACAAC				Guangxi11/03
GATTACACCAAAACCCCTCCGCCAAAA	CCCTCC	CACACTCCCCGACCCACAAC				Guangxi7/02

Слика 2.5. Порамување на 3'-NCR на НП генот во регионот на инсерција на 6 нуклеотиди. Секвенциите добиени во оваа студија се подвлечени. Позицијата на празниот простор е пополнет со „-“. Местото на инсерција е брамено ^[145].

Филогенетските анализи укажуваат на тоа дека само примитивните членови на класа II вирусите се одговорни за колонизација на популацијата на кокошки, а оваа колонизација и конверзија во вируленција се случила повеќе од еднаш во минатото. Во прилог на ова е податокот дека двобазната секвенција на местото на расекување на Ф генот може да биде стекната (генотипови I и II) или наследена (генотипови V – VIII). Веројатноста дека настаните во минатото го следеле ова сценарио е поддржана од набљудувањата што ги отсликуваат различните нивоа на врската вирус – домаќин во секундарниот резервоар. Прво, симултаната појава на авирулентни и вирулентни соеви од ист генотип кај кокошките претставува еволутивен доказ за независно расејување во рамките на еден генотип, и е одраз на рана фаза на колонизација во секундарниот домаќин (пр. Северна Америка во 1940-тите години, Австралија – 1998 година). Под претпоставка дека соевите од групата II се потомци на вирусите коишто порано претставувале посебна лоза во примордијалниот резервоар, изненадувачко е отсуството на овие изолати кај дивите водни птици, што можеби е одраз на ниска застапеност или исчезнување. Второ, епидемиолошките податоци недвосмислено укажуваат дека инсерцијата од шест

нуклеотиди е заедничка изведена карактеристика на монофилетската група (генотипови V – VIII), што значи дека нејзиното отсуство е доказ за примитивна состојба. Дobar пример за ова е наодот во Австралија, каде што вирулентните потомци на генотипот I не ја поседуваат инсерцијата од шест нуклеотиди во 5'NCR регионот на NP генот. Трето, додека може да се каже дека некои велогени вируси од раните генотипови можат да потекнуваат директно или независно од далечни апатогени линии коишто се етаблирани во наивни кокошкини популации (генотип I и II), за вирусите од генотиповите V – VIII е веројатно дека настанале во епизоотиите што се случиле во ерата на вакцинациите (по 1950-тите години).



Слика 2.6. Филогенетско стебло на репрезентативни соеви на ВЊБ коишто ги отсликуваат главните поделби на класи, подлози и генотипови. Стеблото е направено врз основа на делумни Φ ген секвенции (помеѓу позиција nt 47 до 420). Подвлечени се вирусите чиито НП 5'NCR секвенции се добиени во оваа студија. Со (*) се означени целосните геномски секвенции поднесени до EMBL/GenBank, без да содржат информација за инсерција на шест нуклеотиди. Со (+) се означени репрезентативните секвенции кај коишто е познато присуството или отсуството на шест нуклеотиди^[87]. Авирулентните соеви се претставени во рамка, а оние што престојуваат во примордијален резервоар се означени така што се затемнети. Од десна страна се означени наводните места на потекло на генотиповите и примерите на соодветните епизоотии на други места (→ во курсив)^[53].

2.3. Епизоотиологија

2.3.1. Извори

Извори на вирусот може да бидат респираторни секрети/исцедоци и фекалии од инфицирани птици, како и сите делови на трупот. Неколку појави на ЊБ кај птици грабливки се резултат на јадење контаминирани трупови од кокошки, гулаби и потполошки. Птиците го излучуваат вирусот за време на инкубацијата, клиничката фаза и ограничен период во конвалесцентната фаза. Дивите птици и водната живина може да бидат резервоари за лентогените соеви на ЊБ, коишто со мутација можат да станат вирулентни за домашната живина. Некои птици од редот *psittaciformes* се способни да го излучуваат вирусот и до една година, додека живината го излучува 1 – 2 недели. Аерогеното ширење на вирусот зависи од влажноста и густината на инфицираната живина. Кај изведените пилиња, како извор на зараза може да послужат и лушпите од јајца, контаминирани со фекалии, и напукнатите и скршени јајца ^[163, 187].

2.3.2. Патишта на ширење

Постојат повеќе патишта на ширење на ЊБ, како при првото внесување на болеста во одредена земја или регион така и при последично ширење од едно јато на друго јато, и тие се: 1) движење на живи птици; 2) контакт со други животни; 3) движење на луѓе и опрема; 4) движење на живински продукти; 5) ширење преку воздух; 6) контаминирана храна за живина; 7) контаминирана вода; и 8) вакцини. Важноста на сите овие фактори зависи од ситуацијата во којашто се случува епизоотијата ^[9].

2.3.3. Влезна врата

Инфекција со ВЊБ може да случи преку инхалација, ингестија или контакт со мукозни мембрани, особено со коњуктивит. Преносот од една птица на друга зависи од присутноста на вирусот во неговата инфективна форма. Излучувањето на вирусот зависи од органите каде што се размножува, што пак зависи од патотипот на вирусот. Птиците со респираторни клинички знаци го шират вирусот преку аеросол, додека птиците со

интестинални проблеми го шират вирусот директно, преку контаминирани фекалии или индиректно, преку контаминирана храна или вода или преку продукција на мали инфективни честички, настанати од исушени фекалии. Брзината на ширење на вирусот зависи од условите на околината, па така кај респираторниот начин на ширење во бројлерски фарми, вирусот се шири мошне брзо, а кај орално-фекалниот начин на ширење во фарми со кафезни несилки, тој се шири побавно ^[9].

Значењето на вертикалниот начин на ширење на вирусот во настанокот и ширењето на епизоотиите сè уште не е доволно разјаснет. Кај инфекциите настанати на природен начин, не е познато како се инфицира ембрионот, иако е докажано дека вакцината *La Sota* е присутна во поголемиот број репродуктивни органи по вакцинација ^[147]. *Pospisil et al.* ^[143] успеале да докажат присуство на лентоген вирус во ембриони и еднодневни пилиња со потекло од вакцинирано јато, а *Capua et al.* ^[40] успеале да изолираат вирулентен ВЊБ од клоакални брисеви, земени од птици со висок титар на антитела против ЊБ, како и од изведените јајца и еднодневните пилиња од истото јато. *Chen u Wang* ^[45] го изолирале вирусот од мал број изведени пилиња, кои за време на ембрионалниот развој биле инфицирани со многу ниски дози на вирулентен ВЊБ.

2.3.4. Подложност и диспозиција

Вирусот на Њукастелската болест може да биде присутен, како природен или експериментален домаќин, кај 241 вид од 27, од вкупно 50 редови на птици ^[93]. Истите автори во нивниот прегледен труд наведуваат дека е мошне веројатно сите птици да се подложни на инфекција, но интензитетот на заболувањето зависи од видот на птицата.

Домашна живина

Од Њукастелската болест заболуваат сите видови домашна живина, како онаа што се одгледува на комерцијален интензивен начин така и селската живина одгледувана на екстензивен начин. Всушност, најголемиот удар од ова заболување е врз селската живина, кај којашто болеста е честопати одговорна за огромни загуби. Во земјите во развој, вирусите на ЊБ што циркулираат на одредено подрачје се способни да предизвикаат

смртност и до 100% кај незаштитените јата^[164]. Клиничките знаци коишто се среќаваат кај живината прилично се разликуваат во зависност од видот на домаќинот. На пример, кај ноевите се поблаги симптомите од оние кај живината и претежно се со нервни знаци^[11], додека патките можат да не манифестираат никакви знаци во случај на инфекција со вирулентни вируси^[4]. *Alexander*^[7] изјавува дека не постои ниту едно комерцијално јато на живина, коешто ако не е инфицирано, тогаш не е засегнато на некој начин од мерките што се применуваат за контрола на болеста и ширење на вирусот.

Гулаби

Првата изолација на вирулентен ВЊБ, одговорен за панзоотијата кај гулабите, направена е од страна на *Kaleta et al.*^[92] во мостра од Ирак, во 1978 година. Веќе во 1981 година, вирусот стигнува до Европа, во Италија^[33] и потоа се шири низ целиот свет и во 1984/1985 година станува панзоотија^[19].

Некои автори^[19] сметаат дека причината за брзото ширење на вирусот е развиената меѓународна трговија, како и трките и изложбите што се организираат кај овие птици. Гулабовите соеви, најверојатно се појавуваат како резултат на меѓу видско пренесување на вирусот повеќе пати. Ширењето од живина на гулаби мора да се случило многу порано од раните 1980-ти години, бидејќи значајна адаптација и еволуција на овие соеви се случила веќе за време на епизоотијата кај гулабите^[176]. Со помош на моноклонски антитела, вирусот е карактеризиран како антигенска варијанта на ВЊБ^[20]. Поради антигенската различност на овие вируси, од прагматични причини тие се нарекуваат ГПМВ-1 и покрај тоа што овие вируси се способни да ја инфицираат живината, но со намалена вируленција^[123]. Покрај живината, вирусите од групата на ГПМВ-1 се изолирани и од диви гулаби, гугутки како и украсни птици^[91, 112]. Болеста е присутна кај гулабите во изминатите 30 години, но кај нив сè уште поседува ензоотски карактер со повремено ширење на дивите гулаби и гугутките. Оваа група вируси претставува постојана закана за живината^[13].

Кафезни птици – миленичиња

Птиците од редот *psittaciformes* имаат способност повремено да го излучуваат вирусот за продолжени временски периоди, а во некои случаи и до една година^[63]. Овој податок зборува за улогата што овие птици можат да ја имаат за внесување на болеста во друга земја или област. *Senne et al.*^[158], преку изолација на вирус при увоз на повеќе видови кафезни птици, докажува дека и тие можат да бидат значаен извор на вирулентни вируси. *Kaleta* и *Baldauf*^[93] претпоставуваат дека инфекцијата на увезените кафезни птици настанува на местото на потекло на истите или како резултат на ензоотска инфекција во станиците за извоз или пак, како резултат на ширење од живината во непосредна близина на овие станици.

Во 1991 година во САД, како резултат на нелегален увоз се појавила ЊБ кај птици – миленичиња во пет сојузни држави^[135].

Диви птици

Вирусите на ЊБ честопати се изолирани од преселните диви птици, како и од другите водни птици. Најголем број од овие изолати се нисковирулентни за живината и се слични на вирусите од групата на асимптоматскиот цревен патотип.

Од друга страна, во последните десетина години, дивите птици се одговорни за внесување вирулентни вируси кај живината. Дивите птици од секогаш се сметале за потенцијален резервоар за ВЊБ, но само во ретки случаи е докажано дека тие можат да бидат инфицирани и да ја шират болеста^[16]. Најзначајни жаришта на вирулентни ВЊБ коишто се појавиле досега кај дивите птици, се оние кај кормораните (*Phalacrocorax auritus*) во Северна Америка, во 1990-тите години. Првите жаришта се појавиле во централните делови на Канада, во 1990 година, за подоцна да се појават во нејзините западни делови, северозападниот дел на САД и во Калифорнија, во 1997 година^[186]. Во сите случаи, вирусите се изолирани од пцовисани птици и сите се одликуваат со блиска антигена сродност и покрај географската оддалеченост^[105]. Исто така, и во Европа се забележани појави на вирулентни ВЊБ кај дивите птици, и тоа кај фазани во Данска

(1996), кај гуски во Финска (1996) и кај корморани во Данска (2001). Изолираните вируси во овие случаи биле антигено сродни ^[15, 90].

Како одговорни за појавата на ЊБ кај кокошки и мисирки во Велика Британија, во 1997 година, посочени се преселните диви птици кои го пренеле вирусот на домашната живина ^[15]. Појавени се сомневања дека вирусот е востановен кај некои видови диви птици во Европа, по повторната појава на сроден вирус кај фазани во Велика Британија и Франција, во 2005 година ^[4]. Патките и некои други видови водни птици можат да бидат инфицирани со вируси што се вирулентни за живината, но да покажуваат многу малку или никакви клинички знаци. Најголемиот број изолати на вирулентни вируси од дивите птици се добиени со земање примероци од пцовисани птици, пронајдени во близина на инфицирани живинарски објекти. Спротивно на ова, нисковирулентните вируси за живината честопати се изолираат од преселните диви птици и од водните птици ^[7].

Други видови

Под претпоставка дека ВЊБ не е присутен кај другите видови животни, никој не го бара кај нив и покрај фактот дека ВЊБ може експериментално да инфицира голем број животни од другите видови, како што се: свиња, овца, резус мајмун, зајак, сириски хрчак, швајцарски албино стаорец, морско прасе и ласица ^[38, 79, 148].

Првата изолација на ВЊБ од друг вид животно е во 1952 година од страна на *Yates et al.* ^[190] кои го изолирале вирусот од теле. Со помош на новата 'микроереј' чип технологија (*англ. microarray chip technology*), *Sharma et al.* ^[161] успеале да го изолираат вирусот од овца, додека *Yuan et al.* ^[193] изолирале ВЊБ којшто имал висока аминокиселинска хомологија со вакцинирачкиот сој *La Sota*, во подрачје каде што заедно се одгледувале свињи и живина.

Инфекција со ВЊБ кај човек

Првиот случај е опишан од страна на *Burnet*, во 1943 година ^[39]. Во периодот 1948 – 1971 година, во литературата се објавени 35 извештаи за инфекции на луѓе со ВЊБ ^[44]. Вирусот на ЊБ не поседува силен зоонотски потенцијал, т.е. не предизвикува

општа клиничка инфекција кај луѓето, освен благ коњуктивитис, оток на очните капци, засилено солзење и крвавење под коњуктивите^[54, 64, 146]. Луѓето кои се во непосреден контакт со живина, имаат значајно повисок титар на антитела против ВЊБ^[138].

2.3.5. Вируленција и инфекциска доза

Молекуларната основа на вируленција на вирусот е детално опишана во поглавјето 2.4.1. Резултатите што се добиени со паралелна титрација на сојот *Herts 33/56* во ембрионирани јајца ($ELD_{50}=10^{8.2}/0.1$ ml) и пилиња ($CLD_{50}=104.2/0.1$ ml), покажуваат дека доза од $10^4 ELD_{50}$ е потребна за да предизвика инфекција кај пилиња на старост од три недели, кога вирусот е даден по орален пат^[6].

2.4. Патогенеза

Постојат голем број различни соеви на ВЊБ, коишто се разликуваат меѓу себе по изразеноста на симптомите што ги предизвикуваат кај домаќинот и по местото на лезиите што ги предизвикуваат во организмот. Вирусите на ЊБ се поделени во три категории врз основа на нивната патогеност за живината: велогени (високовирулентни), мезогени (умерено вирулентни) и лентогени (нисковирулентни) вируси^[11]. Секој патотип поседува различен тропизам и дистрибуција на вирусот во ткивата на организмот^[42]. Проучувањето на вируленцијата и идентификацијата на вирусните детерминанти се важни бидејќи колку подобро се разберат механизмите што се одговорни за исходот на инфекцијата толку подобро може да се овозможи ефикасен профилактички или терапевтски пристап кај вирусните заболувања.

2.4.1. Молекуларна основа за вируленција/патогеност

При влезот на вирусите коишто поседуваат обвивка, како што е ВЊБ, во клетката домаќин обично е потребно да се изврши активација на вирусните фузиски гликопротеини, преку нивно расекување од страна на интрацелуларните или екстрацелуларните протеази. Овие протеази ги препознаваат местата на расекување,

коишто можат да содржат една или повеќе базни аминокиселини^[100]. Ф протеинот врши фузија на мембраната на вирусот и клеточната мембрана на домаќинот, така што вирусниот геном влегува во клетката и започнува процесот на репликација.

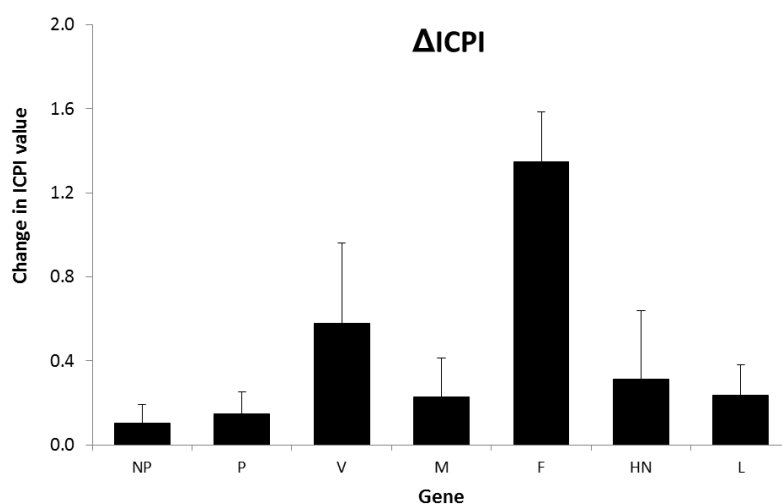
Nagai et al.^[129, 130], во испитувањата направени *in vitro*, докажале дека кај сите испитувани соеви на ВЊБ, вируленцијата е во корелација со расекувањето на Ф протеинот. За да стане вирусот инфективен, потребно е клеточните протеази на домаќинот да го расечат гликопротеинскиот прекурсор Ф0 на Ф1 и Ф2 полипептиди, коишто остануваат врзани со дисулфидни врски^[47, 68, 130]. Лентогените вируси поседуваат монобазен аминокиселински мотив на местото на расекување на Ф генот ¹¹²GR/ K-Q-G-R↓L¹¹⁷ и можат да се расечат екстрацелуларно од страна на протеазите слични на трипсинот (препознаваат само еден аргинин), а коишто се наоѓаат во респираторниот и дигестивниот систем, што значи дека промените и клиничките знаци ќе бидат карактеристични за пореметувања на овие два система.

Мезогените и велогените соеви поседуваат повеќебазен аминокиселински мотив на местото на расекување на Ф генот ¹¹²R/G/KR-Q/K-K/R-R↓F¹¹⁷, и можат да се расечат интрацелуларно од страна на убиквитарните протеази, слични на фурилот, што значи можат да се размножуваат и да предизвикуваат промени секаде во организмот^[69, 130, 132]. Ова доведува до системска инфекција којашто најчесто завршува со летален исход.

Collins et al.^[49], со молекуларни методи потврдува дека се потребни повеќебазни аминокиселини на местото на расекување на Ф генот, за вирусот да биде вирулентен, поточно потребна е базна аминокиселина на резидуата 113, пар на базни аминокиселини на резидуите 115 и 116 и фенилаланин на резидуата 117.

Може да се заклучи дека аминокиселинската секвенција на местото на расекување на Ф протеинот е главен одлучувачки фактор за вируленцијата на ВЊБ^[130, 132]. Во прилог на ова се истражувањата во коишто со помош на реверзна генетика, значајно е зголемена вируленцијата на вирусот со претворање на местото на расекување на лентоген сој со место на расекување карактеристично за велоген сој, со што и вредноста на ИЦПИ е зголемена од 0,00 – 0,01 на 1,12 – 1,28^[134, 139, 150]. Направено е и истражување во обратен правец, така што е намалена вредноста на ИЦПИ кај велоген сој од 1,89 на 0,13, со промена на 3 нуклеотиди на местото на расекување^[84].

Во истражувањата на *Peeters et al.* [139], *Panda et al.* [134] и *Römer-Oberdörfer et al.* [150] вредноста на ИЦПИ на новиот вирус не можела да ги достигне вредностите на природните велогени соеви, што може да значи дека постојат и други фактори коишто можат да влијаат на вируленцијата и обемот на клиничките знаци. Иако Ф протеинот се смета за најзначаен фактор којшто ја одредува патогеноста на вирусот, и другите гени можат да имаат влијание врз неговата патогеност [86, 87, 149]. Врз основа на промените на вредностите на ИЦПИ, *Dortmans* [59] го квантифицирал учеството на другите гени во вируленцијата на вирусот, но сепак треба да се има предвид дека придонесот на овие фактори врз вируленцијата на вирусот може да зависи и од сојот на вирусот [59].



Слика 2.8. Учество на протеините на ВЊБ во вируленцијата на вирусот [59].

2.5. Клиничка слика

Alexander [12] наведува дека е мошне веројатно сите видови птици да се подложни на инфекција, но исходот на инфекцијата (болеста) значајно варира кај различни видови птици. Клиничките знаци кај птици инфицирани со ВЊБ се различни и зависат од вируленцијата на вирусот, видот на домаќинот, староста на домаќинот, коинфекција со други организми, условите на средината и имунолошкиот статус на домаќинот. *Beard* и *Hanson* [30], врз основа на клиничките знаци, ги поделиле ВЊБ на пет патотипови:

1. Висцеротропен велоген – овие вируси се одговорни за акутни инфекции со смртен исход, кај мртвите птици обично се среќаваат кржавења на цревата;

2. Невротропен велоген – овие вируси предизвикуваат висока смртност со респираторни и нервни знаци, а цревните промени обично се отсутни;
3. Мезоген – овие вируси предизвикуваат ниска смртност со респираторни и нервни знаци;
4. Лентоген – овие вируси предизвикуваат благи инфекции на респираторниот систем;
5. Асимптоматски – овие вируси предизвикуваат авирулентни инфекции со размножување на вирусот, најчесто во цревата.

Меѓу овие пет патотипови не може да се направи јасна граница во однос на клиничките знаци коишто ги предизвикуваат, па дури и кај пилиња кои се *specific pathogen-free* (SPF) постои извесно преклопување на клиничките знаци ^[14].

Во теренски услови, кај поблагите соеви на ВЊБ, присутноста на различни фактори можат да предизвикаат клиничките знаци да бидат исти или слични како кај патогените соеви. Инфекциите со лентогените соеви кај возрасната живина можат да варираат од незабележлива инфекција до инфекција со благи респираторни или гастроинтестинални симптоми, додека кај младите пилиња овие инфекции можат да поминат со поизразени респираторни проблеми поради зголемената подложност на секундарни инфекции. Овие соеви се користат за изработка на вакцини.

Инфекциите со мезогените соеви, коишто поседуваат интермедијарна вируленција, вообичаено се системски и можат да предизвикаат респираторно заболување без фатален исход. При инфекции со овие соеви, кај несилки се забележува пад на несивоста проследена со ниска смртност. Во оваа категорија спаѓаат гулабовите соеви (ГПМВ-1), поради нивната интермедијарна вируленција и предизвикувањето нервни знаци. Велогените соеви предизвикуваат висок морбидитет и морталитет. Клиничките знаци кај висцеротропните велогени соеви вклучуваат општа слабост, забрзано дишење, млитавост и потиштеност. За време на инфекцијата се забележува зелен пролив, мускулно тресење, парализа на екстремитетите и оток на главата, особено околу очите.

Кај подложните јата, смртноста може да достигне и 100%. Инфекциите со невротропните велогени соеви првенствено предизвикуваат респираторни пореметувања, проследени со нервни симптоми. Стапката на морбидитет е слична како кај висцеротропните соеви, но

морталитетот е понизок, особено кај возрасните единки. Кај несилките, најизразен наод е забележлив пад на несивоста или потполно престанување на несење јајца.

Клиничките знаци кај мисирките и ноевите се послабо изразени, додека водната живина може да помине без клинички знаци^[77, 171]. Интензитетот на клиничките знаци кај вакцинирани јата зависи од титарот на антитела, колку е повисок титарот толку ќе се намалува интензитетот на клиничките знаци^[23], што значи дека ако птицата е целосно заштитена со вакцинација, може да не манифестира никакви клинички знаци, но да биде носител и разнесувач на вирусот^[40, 136].

2.6. Патоанатомски наод

Слично како кај клиничките знаци, патоанатомските промени не можат да се сметаат за патогномични кај оваа болест, иако тие зависат од патотипот на вирусот, домаќинот и сите други фактори коишто го одредуваат интензитетот на болеста.

Во акутни случаи, единствени видливи промени што можат да се сретнат се дифузни крвавења, а понекогаш може и тие да отсутствуваат. Пцовисаните мрши обично се со знаци на дехидрација и треска. Крвавењата најчесто се лоцирани во цревата, а најистакнати се во мукозата на преджелудникот, слепите црева и тенките црева. Крвавењата во преджелудникот се со петехијален или мал ехимотичен карактер, се наоѓаат на базата и околу предните и задните отвори на папилите. Слезината, Паеровите плочи и останатото лимфно ткиво се едематозни, хеморагични, некротични и улцеративни, и честопати се видливи и без да се отворат цревата. Јајчиците можат да бидат едематозни, хеморагични со дегенеративни промени, така што чест наод кај птици коишто се во фаза на несење е „egg“ перитонитис. Во централниот нервен систем не се забележуваат промени, без разлика на тоа кој патотип е одговорен за болеста. Најчести промени на респираторниот систем се крвавења и конгестија на мукозата на трахејата и белите дробови, како и воспаление на воздушните кеси во случаи на секундарни инфекции^[171].

2.7. Дијагноза

Постојат повеќе методи со коишто може да се открие и карактеризира ВЊБ^[2]. Имајќи ги предвид гореспоменатите патотипови на ЊБ и големиот број клинички знаци што ги предизвикува овој вирус, за адекватна дијагноза не е доволно да се изврши само детекција на ВЊБ или да се докаже инфекција со ВЊБ, туку е потребно да се направи дополнителна карактеризација на вирусот, т.е. да се разграничи дали вирусот е вирулентен или авирулентен. Всушност, за да се ограничи појавата на ЊБ и да се минимизира нејзиниот удар, потребна е брза дијагностика и проценка на вируленцијата на вирусот. Ова е важно поради различните контролни мерки што се применуваат за вирулентните и авирулентните вируси. Недостатокот на патогномонични клинички знаци, дури и кај инфекциите со највирулентните вируси, значи дека при секој обид за негова детекција потребно е да се одреди вируленцијата на вирусот.

2.7.1. Класични методи

Изолација на вирус на ембрионирани кокошкини јајца, типизација со тест на инхибиција на хемаглутинација

Откако *Woodruff* и *Goodpasture* во 1931 година ги вовеле ембрионираните кокошкини јајца во дијагностиката на вирусите, оваа метода денес претставува „златен стандард“ за валидноста на други техники и може да се користи како метода за потврда на дијагнозата. Изолација на вирусот на ембрионирани кокошкини јајца е хармонизиран и препорачан тест за меѓународна трговија на жива живина и производи од живина^[188]. Доколку се користат комерцијални јајца, пожелно е да се проверат на присуство на антитела против ВЊБ, особено ако инокулацијата е во жолчната кеса^[171]. На крајот сите мртви ембриони и сите ембриони оладени на +4 °C се тестираат на присуство на хемаглутинациска активност. Доколку се утврди хемаглутинациска активност на алантоисот, потребно е да се разграничи дали таа е резултат на присуство на некој од 11-те серотипови на АПМВ или некој од 16-те хемаглутинински поттипови на АИВ. Тоа се постигнува со тестот на инхибиција на хемаглутинација со користење специфични антисеруми. Во тестот на инхибиција на хемаглутинацијата може да се јави вкрстена

реакција помеѓу АПМВ-1 и АПМВ-3 (особено кај вирусите изолирани од кафезните или егзотичните птици) или АПМВ-7. Ризикот од погрешна типизација може да се избегне со користење панел на референтни серуми или на моноклонски антитела ^[188].

Моноклонски антитела

Развојот и употребата на моноклонските антитела во средината на 1980-тите години претставувале нов приод за антигенска диференцијација на соевите и изолатите на ВЊБ, на почетокот за дијагностички цели, а подоцна и за карактеризација на вирусот. Поради способноста на мАт да се врзуваат само за еден епитоп, т.е. способноста да препознаат промена на само една аминокиселина во епитопот, тие имаат ограничена можност да детектираат широк спектар на вируси, па поради тоа се препорачува да се користи панел на мАт. Така, *Alexander* ^[19] на почетокот со користење на панел од 9 мАт, а подоцна од 28 мАт извршил карактеризација и групирање на 1.500 вируси. Во оваа студија тој утврдил дека вирусите од иста мАт група поседуваат исти биолошки и епизоотиолошки карактеристики, како и дека вирусите за време на жаришта и епизоотии остануваат прилично добро конзервирани, со што оваа нивна особина може да се искористи за да се претпостави изворот и ширењето на болеста.

Покрај употребата во епидемиолошки студии, како во горниот случај, мАт можат да се користат за диференцијација на *AMPV-1* од другите серотипови на парамиксовирусите ^[122]. Моноклонските антитела U85 ги инхибираат вирусите кај живината, а мАт 161/617 ги инхибираат гулабовите соеви ^[48]. Исто така, тие наоѓаат примена и во идентификација на специфични вируси, на пример во разликување вакцинални од епизоотски вируси ^[165] и во разликување на варијатните гулабови соеви од класичните соеви ^[18, 20, 137].

Групирањето на вирусите врз основа на нивната способност да ги врзуваат мАт, укажува на одреден степен на сродност меѓу вирусите сместени во иста група ^[19]. Од друга страна, нивната употреба за карактеризација на вирусите од класата I е прилично ограничена, бидејќи сите досегашни мАт се развиени и оптимизирани да ги препознаваат само вирусите од класата II ^[50, 98].

Интрацеребрален патоген индекс

Класичен начин за патотипизација на соевите на ВЊБ е тестот за одредување на ИЦПИ којшто се одликува со точност и сензитивност ^[188]. Разликите во вируленцијата на различни изолати на ВЊБ се обележуваат од 0,0 (авирулентни вируси) до 2,0 (високовирулентни вируси). Некои автори ја критикуваат употребата на тестот на ИЦПИ за одредување на вируленцијата во научни цели, поради тоа што интрацеребралниот начин на инокулација не е природен начин на инфекција, и во некои случаи фенотипските разлики забележани по интрацеребрална инокулација не биле забележани по инфекција преку природни патишта ^[167, 179].

Иако овој тест е задолжителен за одредување на вируленцијата на изолатот, неговата сензитивност може да биде недоволна за да ги открие суптилните промени во вируленцијата ^[59]. *In vivo* тестовите за одредување на патотипот треба секогаш да бидат придружени со секвенционирање, особено кај ГПМВ-1, поради тоа што местото на расекување на Φ генот не секогаш кореспондира со индексот на ИЦПИ ^[58].

2.7.2. Молекуларни методи

Ако се има предвид дека класичните дијагностички методи (вирус изолација на јајца и тестовите за одредување патогеност) одземаат доста време и се скапи, а интерпретацијата на серолошките тестови е комплицирана поради масовната употреба на живи вакцини кај живината, денес широка примена во лабораториите низ светот наоѓаат молекуларните методи за детекција, одредување на патогеноста и филогенетска карактеризација на ВЊБ. Овие методи се брзи, со што значајно се намалува времето за имплементација на контролни мерки во случај на детекција на вирулентен ВЊБ. Тестовите на *RT-PCR* овозможуваат брза амплификација, со што претставуваат неопходна алатка за детекција на вирусите.

Во молекуларната дијагностика на ВЊБ, потребно е прво да се направи реверзна транскрипција на вирусната РНК во комплементарна ДНК (кДНК), со помош на ензимот РНК зависна ДНК полимераза, а потоа да се амплифицира кДНК. Овие два чекора, денес можат да се направат во една епруветичка, во еден инструмент за *PCR* ^[99]. Молекуларните

методи можат да бидат методи за детекција на вирусот и обично нивна цел е детекција на дел од М или L генот и методи за одредување на вируленцијата на вирусот / патотипизација и обично нивна цел е детекција на дел од Ф генот. Со последниве се врши идентификација на авирулентни или вирулентни соеви.

Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција

Еден од првите трудови во оваа област е оној на *Jestin* и *Jestin* ^[89], кои развиле техника за амплификација и детекција на делот на Ф генот на ВЊБ од инфективни алантоисни течности. Негативната страна на овој тест била што по дигестија со рестриktivни ензими на амплификатот и негова анализа на гел електрофорезата, авторите добиле неконзистентни резултати.

Понатаму, *Collins et al.* ^[49] го амплифицирале делот на Ф генот којшто го опфаќа местото на расекување и со дедукција на нуклеотидната секвенција го одредувале патотипот на вирусот.

За да се подобри сензитивноста, *Kant et al.* ^[94] развиле *nested PCR* којшто покажал подобри резултати, но поради подложноста за лажно позитивни резултати, оваа метода не е идеална кај лаборатории кои обработуваат голем број примероци.

Gohm et al. ^[70] развиле *RT-PCR* техника за детекција на ВЊБ (место на расекување на Ф ген) од инфицирани ткива и од фекалии кај експериментално и природно инфицирани кокошки. Авторите нагласиле дека поради тропизмот кон ткивата на различните соеви на ЊБ, треба да се земат примероци од поголем број различни органи бидејќи ниту еден орган не бил секогаш позитивен.

Aldous et al. ^[5], врз база на техниката на *Collins et al.* ^[49], направиле *RT-PCR* на 174 изолати, добиени од инфективни алантоисни течности што подоцна ги искористиле за класификација на вирусите на ЊБ. Еден од најсериозните проблеми при *RT-PCR* техниката е потребата од обработка по амплификацијата (потребни се два посебни чекори за реверзната транскрипција и полимеразната верижна реакција), што претставува можност за контаминација на лабораторијата и вкрстена контаминација на примероците.

Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време

Денес постојат повеќе *RT-qPCR* техники коишто служат за детекција на ВЊБ. Овие техники се брзи, со добра сензитивност и се одвиваат во еден чекор, т.е. во една епруветичка, со што е подобрена и нивната специфичност. *Aldous et al.* ^[2] први користеле *Taqman* хидролизирачки проби за детекција на Φ генот, но нивната метода не била тестирана на клинички примероци. Од тогаш, употребата на хидролизирачките проби има широка примена во техниката на *RT-qPCR*. 'Прајмерите' кај овие тестови се дизајнирани за да го детектираат високо конзервирааниот матрикс ген на ВЊБ, на тој начин детектирајќи ги поголемиот број генотипови од класа II, без разлика на нивната вируленција ^[24, 141, 170, 185].

Wise et al. ^[185], како резултат на епизоотијата во Калифорнија во 2002 година, развиле *RT-qPCR* за детекција на вирусите од класата II од клинички примероци, којшто бил потврден од страна на *USDA*. Овој тест нашол широка употреба во Северна Америка и Европа. Подоцна, *Cattoli et al.* ^[41] утврдиле дека со овој тест можат да се добијат и лажно негативни резултати, како резултат на генетската варијабилност на M генот, и со внесување модифицирани нуклеотиди дизајнирале нова хидролизирачка проба којашто била заклучена на 6 нуклеотидни позиции (на англ. *locked nucleic acid (LNA) probe*), со што ја подобриле сензитивноста на претходниот тест.

Kim et al. ^[98] развиле *RT-qPCR* техника којашто имала способност да ги детектира и вирусите од класа I, коишто биле изолирани од пазарите со живи птици во Хонг Конг, но сепак, поради некомплементарноста на хидролизирачката проба со геномот на вирусот, на нивното место на врзување не биле детектирани голем дел на вирусите од класата I. Следната година, *Kim et al.* ^[97] развиле мултиплекс *RT-qPCR* за детекција на широк спектар на вируси, припадници на класата I и класата II, но овој пат цел на детекција бил конзервиран регион на полимеразата (L) генот. Оваа метода имала десетпати повисока сензитивност од претходните методи и била во состојба да ги детектира вирусите коишто претходно не биле детектирани. Врз основа на сличен принцип, *Fuller et al.* ^[66] развиле *RT-qPCR* којшто детектирал регион од 150 БП на L генот со користење две хидролизирачки проби, со што можело да се детектираат вируси од класата I и класата II од клинички и од амплифицирани примероци.

За детекција на вирулентни соеви се применува *RT-qPCR*, којшто го детектира делот на Φ генот. Протоколот според *Wise et al.* ^[185] е широко употребуван протокол, поради тоа што е потврден од страна на *USDA* и е способен да идентификува широк опсег на изолати од различни локации во светот, иако авторите навеле дека намената на овој тест не била да ги детектира вирулентните вируси секаде во светот. Со овој протокол не можел да се детектира вирус изолиран од гугутка, во Италија во 2000 година ^[172], поради некомплементарност помеѓу хидролизирачката проба и Φ генот во четири нуклеотиди на местото на нивното врзување ^[96]. Испитувањата на *Kim et al.* ^[95] покажале дека со истиот протокол не биле детектирани 15 изолати од гулаби од САД, коишто поседувале високовирулентен аминокиселински мотив, туку овие изолати успеале да ги идентификуваат со нова хидролизирачка проба што претходно ја дизајнирале ^[96]. Имајќи ја предвид посебноста на гулабовите соеви, *Barbezange* и *Jestin* ^[27] развиле RT-nested PCR за детекција на ГПМВ-1, директно од органи на инфицирани птици. *Fuller et al.* ^[67] успеале да развијат протокол со којшто се добива производ од 150 БП на местото на расекување на Φ генот, со којшто може во исто време да се детектира и да се разграничи дали детектираните вируси се авирулентни или вирулентни, така што користат две хидролизирачки проби. Во овој протокол може да се додаде и трета хидролизирачка проба за детекција на вирусите од класата I. Изгледа дека некомплементарноста на 'прајмерите' се толерира повеќе од некомплементарноста на хидролизирачката проба ^[42]. Покрај користењето на *Taqman* хидролизирачките проби, со цел да се избегне ризикот од лажно негативни резултати поради некомплементарност на целната ДНК и хидролизирачката проба, за детекција на ВЊБ можат да се користат и други *Rt-qPCR* техники како што се *SYBR Green* и *LUX*, кај коишто не е потребно присуство на хидролизирачка проба туку само флуорогени 'прајмери' ^[24, 141, 169]. Од страна на *Pham et al.* ^[142] е опишан методот RT-LAMP којшто вклучува изотермална реакција, така што нема потреба од термален апарат, а амплификатот е видлив со промена на бојата во епруветичката. Овој тест е неодамна подобрен од страна на *Li et al.* ^[110].

Сепак, сè уште постојат класичните проблеми поврзани со молекуларната детекција, особено генетската варијабилност на овие вируси и потенцијалот за мешани инфекции со високо и нисковирулентни вируси. Ниту една од досега развиените методи не е способна со добра осетливост да ги детектира сите лози на ВЊБ ^[22]. Поради ова,

треба секогаш истовремено да се користат методите на изолација на вирусот на ембрионирани кокошкини јајца со техниките на PCR ^[126].

2.7.3. Секвенционирање

Широко употребувана метода за секвенционирање на ДНК е техниката според *Sanger et al.* ^[153], којашто е заснована на примена на дидеоксинуклеотиди коишто кога се вградуваат во новосинтетизираниот ланец на ДНК, прекинува елонгацијата на ланецот. На овој начин во реакцијата се добива мешавина од различни должини на ДНК ланци, од коишто секој завршува со различно означен дидеоксинуклеотид.

Голем број автори го користат секвенционирањето за да ја одредат вируленцијата и да ги проценат генетските разлики, генотиповите и филогенетските карактеристики на вирусите на ЊБ ^[50, 51, 116, 152, 156, 174]. Со овие техники се доволни и 250 нуклеотиди за веродостојна филогенетска анализа ^[116, 156]. *Aldous et al.* ^[5] секвенционирале 174 изолати на ВЊБ со различно географско и временско потекло и од различни домаќини, и ги споредиле со секвенции на 164 изолати, објавени во *GenBank*. Тие секвенционирале фрагмент во должина од 375 нуклеотиди, којшто го опфаќа местото на расекување и сигналниот пептид на Ф генот. Врз основа на нуклеотидната секвенција на овој фрагмент, заклучиле дека може да се направи брза патотипизација на вирусот, како и да се одреди неговото филогенетско потекло.

Побрза и поевтина патотипизација на ВЊБ од класичниот начин на секвенционирање може да се постигне со методата пиросеквенционирање, со којашто е извршена амплификација и секвенционирање на фрагмент во должина од 30 БП на местото на расекување на Ф генот ^[55]. Оваа метода е заснована на ослободување пирофосфатен молекул, секогаш кога еден нуклеотид ќе се вгради во новосинтетизираниот ланец. Овој молекул започнува ензимска реакција што резултира со ослободување флуоросцентен сигнал, којшто е детектиран од страна на инструментот, а е пропорционален со количината на ослободениот пирофосфатен молекул ^[151].

2.8. Контролни мерки

За ЊБ не постои терапија. Контролата на ЊБ претставува значаен ограничувачки фактор за одгледувањето на селската живина во многу земји низ светот и претставува предизвик за националните ветеринарни власти, како и за фармерите. Во глобални рамки, не е можно исти контролни мерки да се применуваат во секоја земја. Со оглед на развиеноста на земјата и ветеринарната структура, тие треба да се адаптираат на можностите на земјата. Впрочем, ова го истакнуваат и *Higgins* и *Shortridge*^[76] кои зборуваат за важноста на градењето на контролните мерки за секоја земја поединечно и предупредуваат за догматската примена на мерките, коишто се успешни за една земја, да се применат во друга земја.

2.8.1. Дефиниција на Њукастелската болест

Со развојот на сознанијата околу вирусот и ширењето на болеста, а со цел да се олесни сè поинтензивната меѓународна трговија со живина и продукти од живина, меѓународната заедница предвидува стандардна дефиниција за ЊБ.

Во последната деценија, во одреден број научни трудови почнува да се употребува терминот АПМВ-1 како синоним за ВЊБ, иако од неодамна некои автори го користат терминот ВЊБ за да ја опишат вирулентната форма на болеста, додека АПМВ-1 ги опфаќа сите соеви од серотипот 1, вклучувајќи ги асимптоматските, нисковирулентните и високовирулентните соеви^[95].

Според *OIE*^[188], дефиницијата за пријавување жариште на ЊБ е следна:

Њукастелската болест е дефинирана како инфекција на птици, предизвикана од вирусот на авијарниот парамиксовирус серотип 1 (АПМВ-1), којшто ги исполнува еден од следните критериуми за вируленција:

- а) вирусот поседува интрацеребрален патоген индекс (ИЦПИ) кај еднодневни пилиња (*Gallus gallus*), од 0,7 или повисок, или*
- б) докажани се повеќе базични аминокиселини во вирусот (директно или по пат на дедукција) на С крајот на Ф2 протеинот и фенилаланин на резидуата 117, којашто е N крај на Ф1 протеинот. Терминот „повеќе базични аминокиселини“ се однесува на барем*

три резидуи на аргинин или лизин помеѓу резидуите 113 и 116. Доколку не може да се докаже карактеристичниот мотив на аминокиселинските резидуи објаснети погоре, потребно е да се изврши карактеризација на вирусот со ИЦПИ.

Во оваа дефиниција, аминокиселинските резидуи се нумерирани од N крајот на аминокиселинската секвенција одбиена од нуклеотидната секвенција на Ф0 генот, 113 – 116 одговара на резидуите -4 до -1 од местото на расекување.

Од друга страна, дефиницијата на Њукастелската болест од страна на Европската комисија, објавена во Council Directive 92/66/EEC ^[43] е:

Њукастелската болест е инфекција на живината, предизвикана од кој било птичји сој на парамиксовирус 1 со интрацеребрален патоген индекс (ИЦПИ) кај еднодневни пилиња, поголем од 0,7.

Подоцна, оваа дефиниција е изменета имајќи ги предвид новите достигнувања во молекуларната дијагностика и потребата од прецизна дефиниција ^[17]:

„Њукастелската болест“ е дефинирана како инфекција на живината, предизвикана од вирус на авијарен парамиксовирус серотип 1 (АПМВ-1), којшто има интрацеребрален патоген индекс (ИЦПИ) кај еднодневни пилиња (Gallus gallus), од 0,7 или повисок.

Како алтернатива на ИЦПИ тестот, присуството на вирусот на „Њукастелската болест“ може исто така да се потврди со докажување (директно или по пат на дедуција) на повеќебазични аминокиселини [најмалку три резидуи на аргинин или лизин помеѓу резидуите 113 и 116¹] на С крајот на Ф2 протеинот и фенилаланинот [F] на резидуата 117, којшто е N крај на Ф1 протеинот. Доколку не може да се докаже карактеристичниот мотив на аминокиселинските резидуи објаснети погоре, потребно е да се изврши карактеризација на вирусот со ИЦПИ.

Во Македонија, приближна дефиниција на ЊБ е онаа во сè уште важечкиот „Правилник за мерките за сузбивање и искоренување на њукастел-болеста кај пернатата живина“ ^[198]:

Како заболена од њукастл-болеста кај перната живина се смета пернатата живина кај којашто со клинички преглед, со патоанатомски наод и со лабораториско испитување ќе се докаже дека боледува од њукастл-болест кај перната живина, а со лабораториска

¹ броено од N крајот на аминокиселинската секвенција, одземена од нуклеотидната секвенција на Ф0 генот, 113 – 116 одговара на резидуите -4 до -1 од местото на расекување

постапка, директно (со изолација на вирусот) или индиректно (со серолошко испитување), ќе се утврди причинителот на таа болест.

2.8.2. Мерки на биосигурност

Во земјите и регионите што се слободни од вирулентни ВЊБ, основна цел е да се спречи влезот на вирусот. На комерцијалните фарми, целта на мерките на биосигурност е да го спречат влезот на вирусите во јатото. Мерките на биосигурност започнуваат уште при планирање на фармите и вклучуваат одвоеност на објектите и јатата, изолација на инкубаторските станици од други фарми, одгледување само еден вид на една локација и обезбедување хигиенски исправен извор на вода. Во текот на одгледувањето треба да се дозволуваат само неопходни посети на фармата, објектите и магацините за храна и вода; треба тие добро да се заштитени од диви птици; да се применуваат програми на дезинфекција, дезинсекција и дератизација на фармата и околината; дезинфекција на опремата и хигиена на персоналот. Исто така, од голема важност е едукацијата на фармерите за начините на ширење на вирусот и мерките како да се избегне негово појавување.

Од друга страна, поради начинот на одгледување на селската живина, како и социоекономскиот статус на сопствениците, многу е потешко да се применат мерките на биосигурност во овој сектор и поради тоа живината од овој сектор ја прави повеќе подложна на ЊБ^[16].

2.8.3. Вакцинација

Постојат три типа вакцини што се користат во контролата на ЊБ: живи лентогени, живи мезогени и инактивирани вакцини. Живите лентогени вакцини обично се добиваат од теренски вируси коишто имаат ниска патогеност за живината, а произведуваат адекватен имун одговор и тука најчесто спаѓаат соевите *La Sota*, *HB1* и *F*. Мезогените вакцини можат да предизвикаат силни вакцинални реакции кај имунолошки наивната популација и не се препорачуваат за првична вакцинација. Овие вакцини се доволно вирулентни да потпаднат под дефиницијата на *OIE* за ЊБ^[11].

Инактивираните вакцини најчесто се користат по првична вакцинација со живи вакцини и произведуваат висок титар на антитела против ЊБ ^[32].

Рекомбинантните вакцини се добиваат со инсерција на гените што ги кодираат површинските протеини во друг вид вирус. Предноста на овие вакцини е што се постабилни – со една вакцина може да се предизвика заштита против повеќе заболувања и можно е да се детектираат антитела против дивиот вирус кај вакцинирани единки ^[120, 127].

Вакцините што се користат се претежно наменети за комерцијалната живина што се чува во големи, затворени јата со иста старост. Производителите прават вакцини што се термолабилни и содржат 1.000 или 2.500 дози. При нивната примена мора да се осигура ладен ланец. Спротивно на ова, селската живина се чува во мали јата со различна старост, на отворен и затворен простор, и ваквите вакцини за оваа категорија се несоодветни ^[1].

Во земјите каде што е потребно сопствениците на селската живина да ја купат вакцината за да ја вакцинираат живината, тоа е дополнителен проблем и со тоа се намалува вакциналната покриеност. Во подрачја каде што не може да се обезбеди ладниот ланец за примена на вакцината, неопходна е примена на термостабилни вакцини ^[192]. Вакви термостабилни вакцини, со успех се користат во некои земји на Африка ^[1] и Југоисточна Азија ^[164].

3. ЦЕЛ НА ИСПИТУВАЊЕТО

Њукастелската болест е присутна на сите континенти на земјината топка и таа покрај видовите на домашна живина се јавува и кај гулабите, егзотичните птици (птици миленичиња) и дивите птици. Велогените соеви на вирусот на Њукастелската болест предизвикуваат директни економски штети, но и контролните мерки, вклучително и вакцинацијата, претставуваат товар за индустријата. Од друга страна, населението во руралните средини каде што живината е главен извор на протеини од анимално потекло е засегнато при појава на ова заболување.

Во Република Македонија, и покрај редовната вакцинација на комерцијалната живина (родителски јата од тешка и лесна линија, подмладок, несилки и бројлери) и задолжителната вакцинација на „селската“ живина, пропишана во годишните наредби за здравствена заштита на животните, се бележи појава на ова заболување коешто предизвикува силни социјално-економски импликации за општеството во целина. Досега, во Република Македонија се опишани повеќе епизоотии од средината на минатиот век до денес, но ниту еднаш причинителот не бил целосно карактеризиран со класични вирусолошки и молекуларни методи. Имајќи го предвид горе изнесеното во овој труд, како главна цел беше поставена идентификација и карактеризација на вирусите на Њукастелската болест, коишто циркулираат во Република Македонија во последната деценија со меѓународно признати и докажани методи.

За да ја оствариме оваа цел, ги поставивме следните задачи:

1. Да се изврши изолација на вирусот на Њукастелската болест на ембрионирани кокошкини јајца;
2. Да се идентификува и да се одреди патотипот на вирусот на Њукастелската болест со класични методи (инхибиција на хемаглутинација и интрацеребрален патоген индекс);
3. Да се докаже вирусот на Њукастелската болест со молекуларни методи (полимеразна верижна реакција);
4. Да се одреди вируленцијата на вирусот на Њукастелската болест со молекуларни методи (полимеразна верижна реакција);
5. Да се одреди аминокиселинскиот состав на генот одговорен за вируленцијата на вирусот на Њукастелската болест (секвенционирање);
6. Да се изврши филогенетска карактеризација на соевите на вирусот на Њукастелската болест и да се направи споредба со соевите во регионот, Европа и пошироко;
7. Да се имплементираат дијагностички техники и методи согласно националното законодавство и законодавството на ЕУ и стандардите што се пропишани од *OIE*.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

4.1. Материјал

4.1.1. Вируси на Њукастелската болест

Во нашите испитувања се користени 21 сој на вирусот на Њукастелската болест, откриени кај домашна живина, гулаби и диви птици во Република Македонија, во периодот од 2002 до 2012 година. Од вкупно испитуваните соеви, 16 изолати се добиени од алантоисна течност по нивна инокулација на 9 до 11 дена стари ембрионирани кокошкини јајца, додека 5 соеви немаа способност за раст на инокулирани ембрионирани кокошкини јајца и се докажани од клинички примероци, т.е. од хомогенати од внатрешни органи. Вирусите коишто се докажани и анализирани во оваа студија, именувани се на следниот начин:

серотип / домаќин (вид на птица од којашто е изолиран вирусот) / земја на потекло (географска локација) / лабораториски идентификациски број (референтен број) / година на мострирање (изолација)

Пример: NDV/chicken/Macedonia/070/2005

Табела 4.1. Податоци за откриените вируси на Њукастелската болест во Република Македонија во ова истражување

Ознака на вирус	Вид на животно	Датум на мострирање (дд.мм.гггг)	Користени органи во дијагностика	Локација	Координати
NDV/chicken/Macedonia/082/2002	Фармска кокошка	21.11.2002	мозок	Валандово	N 41°19'05. E 22°32'50.
NDV/chicken/Macedonia/083/2003	Селска кокошка	12.8.2003	пул од внатрешни органи	Непозната	-
NDV/chicken/Macedonia/080/2004	Селска кокошка	5.4.2004	мозок	с. Челопек, Тетово	N 41°56'21. E 21°00'27.
NDV/chicken/Macedonia/062/2005	Селска кокошка	28.10.2005	мозок, трахеја	с. Сопиште, Скопје	N 41°57'00. E 21°25'12.
NDV/chicken/Macedonia/069/2005	Селска кокошка	16.10.2005	мозок	с. Могила, Битола	N 41°06'29. E 21°22'41
NDV/chicken/Macedonia/070/2005	Селска кокошка	16.10.2005	мозок	с. Могила, Битола	N 41°06'29. E 21°22'41.
NDV/chicken/Macedonia/421/2005	Фармска кокошка	XX.11.2005	пул од внатрешни органи	с. Породин, Битола	N 40°56'24. E 21°22'35.
NDV/starling/Macedonia/068/2006	сколовранец	14.1.2006	мозок, трахеја	Демир Капија	N 41°24'32. E 22°14'39.
NDV/chicken/Macedonia/071/2006	Селска кокошка	25.1.2006	мозок, трахеја	с. Србјани, Кичево	N 41°29'09. E 20°57'05.
NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	Гулаб	30.11.2007	пул од внатрешни органи	Неготино	N 41°28'57. E 22°05'32.
NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	Гулаб	XX.XX.2007	пул од внатрешни органи	Неготино*	N 41°28'57. E 22°05'32.
NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	Гулаб	XX.XX.2007	пул од внатрешни органи	Неготино*	N 41°28'57. E 22°05'32.

Табела 4.1. (продолжение) Податоци за откриените вируси на Њукастелската болест во Република Македонија во ова истражување

Ознака на вирус	Вид на животно	Датум на моистрирање (дд.мм.гггг)	Користени органи во дијагностика	Локација	Координати
NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	Гулаб	18.9.2008	пул од внатрешни органи	с. Врапчиште, Гостивар	N 41°49'59. E 20°52'58.
NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	Гулаб	XX.XX.2008	пул од внатрешни органи	Радовиш	N 41°38'09. E 22°28'00.
NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	Гулаб	XX.XX.2008	пул од внатрешни органи	Гостивар	N 41°48'03. E 20°54'50.
NDV/chicken/Macedonia/231/2010	Селска кокошка	10.2.2010	пул од внатрешни органи	с. Ранковце, Крива Паланка	N 42°10'03. E 22°07'03.
NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	Гулаб	12.3.2010	пул од внатрешни органи	Неготино	N 41°28'57. E 22°05'32.
NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	Гулаб	4.4.2011	црева	Струмица	N 41°26'15. E 22°38'33.
NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	Гулаб	XX.5.2011	пул од внатрешни органи	с. Трубарево, Скопје	N 41°58'51. E 21°31'37.
NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	Гулаб	XX.7.2011	пул од внатрешни органи	с. 'Ржаничино, Скопје	N 41°55'32. E 21°37'49.
NDV/feralpigeon/Macedonia/9701/2012	Див гулаб	17.10.2012	пул од внатрешни органи	Битола	N 41°01'58. E 21°20'25.

XX – непознат датум

* – исто одгледувалиште

Покрај соевите на вирусот на Њукастелската болест, откриени на територијата на Република Македонија, коишто беа предмет на ова истражување, во оваа дисертација се користени и достапни референтни секвенции што припаѓаат на поединечен генотип објавени во базата на гени *Genbank*, како и секвенции од регионот, објавени во базата на гени *Genbank* или пак, добиени врз основа на професионална соработка со цел да се проучи филогенетската сродност со македонските соеви.

Табела 4.2. Пристапни броеви од GenBank на секвенциите што се користени за порамнување со македонските соеви и изработка на филогенетски стебла

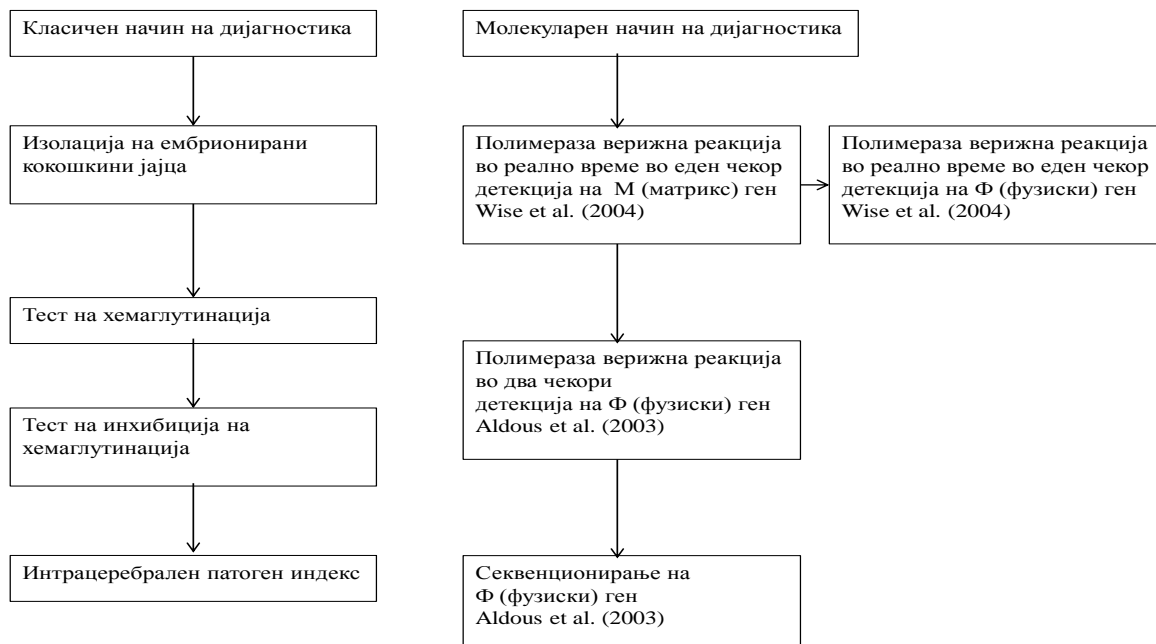
Ознака на вирус	Генотип	Пристапен број	Ознака на вирус	Генотип	Пристапен број
chicken/N.Ireland.Ulster/67	I	AY562991	DE-R49/99	Class I	DQ097393
La_Sota	II	AF077761	Sterna/Astr/2755/2001	VIIb	AY865652
Mukteswar	III	EF201805	KBNP-4152	VIIId	DQ839397
Herts/33	IV	AY741404	JSD0812	VIIId	GQ849007
JS/9/05/Go	III	FJ430160	Goose_paramyxovirus_SF02	VIIId	AF473851
IT-227/82	VIb	AJ880277	Muscovy_duck/China(Fujian)/FP1/02	VIIId	FJ872531
chicken/U.S.(CA)/1083(Fontana)/72	VIa	AY562988	KAZ-342-03	VIIId	FJ434391
cockatoo/Indonesia/14698/90	VIIa	AY562985	CN/ZJ-1/00	VIIId	AF431744
France/EFRPI99117	II	AY175702	NA-1	VIIId	DQ659677
South Africa/PZAPI99091	I	AY562991	chicken/China/Guangxi7/2002	VIIId	DQ485229
Italien	IV	EU293914	chicken/China/Guangxi11/2003	VIIId	DQ485231
B1	II	NC002617	F48E8	IX	FJ436302
cormorant/Canada/98CNN3-V1125/1998	V	GQ288382	QH4-85	VIII	AF378252
chicken/China/Guangxi9/2003	VIIId	JF343539	TW-08-05	VIIe	AB512615
mixed_species/U.S./Largo/71	V	AY562990	H10-72	V	AF001107
JS/1/02/Du	IX	FJ43630	Israel70	VIa	AF001111
FJ/1/85/Ch	IX	FJ436304	1168_84GB_pigeon	VIb	AF109885
dove/Italy/2736/00	VIb	AY562989	PB9601	VI	KC143163
CZ3898-96	VIIc	AF109883	H310-82	VIa	AF001112
NDV05-066	VIIId	DQ439921	DK1-95	VIa	AF001129
China-G1F3-03	VIIId	AY390299	TW94P	VIIa	AF083961

Табела 4.2. (продолжение) Пристапни броеви од GenBank на секвенциите што се користени за порамнување со македонските соеви и изработка на филогенетски стебла

Ознака на вирус	Генотип	Пристапен број	Ознака на вирус	Генотип	Пристапен број
SRB/749/07/gugutka	VIIId	GU227738	ZA360-95	VIIb	AF109876
QH4	VIII	FJ751919	SRB-2387-07	VIIId	-
SRB/1038/07/kobac	VIIId	GU227739	Chicken/Bulgaria_-_Kardjali/05	VIIId	-
SRB-7625-09-golub	VIIb	-	Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06	VIIId	-
SRB-58-10-golub	VIIb	-	Chicken/Bulgaria_-_Dobrich/06	VIIId	-
SRB-2435-07	VIIId	-	Chicken/Bulgaria_-_Rasgrad/06	VIIId	-
SRB-6764-06	VIIId	-	Chicken/Bulgaria_-_Kardjali/06	VIIId	-
SRB-7092-06	VIIId	-	Silistra/Popina/BG-31/96	VIIb	-
HR-Zelina-94	V	-	BG_7088_06_B1_Slanchohled_2006	VIIId	-
BG_470_09_817_CK_Mamarchevo_2009	VIIId	-	BG_2437_07_4_Ruska_Biala_2007	VIIId	-
BG_470_09_814_CK_Kazatsite_2009	VIIId	-	NDV/chicken/Kardam/2008	VIIId	-

4.2. Методи

Дијагностичкиот алгоритам на методи, којшто е применет во согласност со меѓународно препорачаните методи за прогласување жариште на ЊБ [43,188].



Слика 4.1. Шематски приказ на применети дијагностички методи

4.2.1. Обработка на органите од умрени птици

Органите од умрени птици, пристигнати во лабораториите на Ветеринарниот институт при Факултетот за ветеринарна медицина – Скопје, се хомогенизирани со стерилен песок во толчник со додавање на 2 ml антибиотски медиум, подготвен според препораките на *OIE*. Вака добиената суспензија отстојува 2 часа на собна температура и се центрифугира на 3.000 вртежи во минута, за време од 15 минути. Понатаму, се проверува стерилноста на супернатантот со негово засејување на крвен агар на 37 °C за 24 часа, и доколку е стерилен се пристапува кон негова инокулација на ембрионирани кокошкини јајца. Доколку супернатантот не е стерилен, се додава 20% раствор на пеницилин и стрептомицин или се филтрира низ бактериски филтри и повторно се засејува на крвен агар.

4.2.2. Изолација на вирусот на Њукастелската болест на ембрионирани кокошкини јајца

Подготвените супернатанти од хомогенатите од органи од претходниот чекор се инокулирани во алантоисна празнина на 9 до 11 дена стари ембрионирани кокошкини јајца, во количина од 0,2 ml во секое од вкупно 5 ембрионирани кокошкини јајца. По инокулацијата, јајцата се инкубирани на 37 °C во траење од 5 дена. Секој ден е вршено лампирање на јајцата, со цел да се утврди виталноста на ембрионот. Умрените ембриони во првите 24 часа се сметани за неспецифична смртност и се отстрануваат од понатамошно испитување, додека умрените ембриони по овој период, како и останатите живи ембриони по 5-от ден се ставени во фрижидер на +4 °C преку ноќ, и кај нив е одредувана хемаглутинарачка активност на алантоисната течност со 5% и 1% суспензија на еритроцити, добиени од кокошки слободни од антитела на Њукастелската болест, во постапката на брза ХА на плочка. Алантоисните течности од ембрионите, коишто не покажаа хемаглутинарачка активност, повторно се инокулирани во нови 5 ембрионирани кокошкини јајца, т.е. направена е втора и трета пасажа на истите. Со алантоисните течности коишто покажаа хемаглутинарачка активност и доколку кај нив не беше утврдено присуство на бактерии се продолжи во понатамошна постапка, во тест на хемаглутинација на микротитарска плоча. Со секоја серија на инокулација, користени се контроли и тоа: 5 неинокулирани јајца, 5 инокулирани јајца со *PBS* и 5 инокулирани јајца со авирулентен сој *La Sota*.

4.2.3. Тест на хемаглутинација на алантоисните течности

Тестот на ХА на алантоисните течности во микротитарска плоча има за цел да го одреди титарот на вирусот којшто предизвикал умирање на ембрионите и покажал хемаглутинарачка активност на плочка.

На микротитарска плоча со V дно, во сите дупчиња се диспензира изотоничен *PBS* (0,01 M), *pH* 7,0 – 7,2 во количина од 0,025 ml. Во првото дупче од секој ред се диспензира 0,025 ml на инфективна алантоисна течност и се врши двократно разредување низ

плочата, до крајот на редот. На овој начин се добива почетно разредување на вирусот од 1:2 па сè до 1:4096. Повторно се додава изотоничен *PBS* (0,01 M), *pH* 7,0 – 7,2 во количина од 0,025 ml во сите дупчиња, и на крајот се врши додавање 1% суспензија на еритроцити, добиени од кокошки слободни од антитела на Њукастелската болест, во количина од 0,025 ml во сите дупчиња. Плочата нежно се протресува и се инкубира на собна температура (околу 20 °C), за време од 40 минути. По инкубацијата, плочата се закосува и се набљудува дали има појава на „солзење“ на еритроцитите. Највисокото разредување на инфективната алантоисна течност, коешто дава комплетна ХА (нема појава на „солзење“), се смета за титар на вирусот и претставува 1 ХАЕ. Во тестот се вклучени и контрола на еритроцитите (само *PBS* и еритроцити) и контролен антиген на вирусот на Њукастелската болест, сој *La Sota*.

4.2.4. Тест на инхибиција на хемаглутинација на алантоисните течности

Тестот на ИХА има за цел да го одреди типот на вирусот со користење поликлонски и моноклонски антисеруми. Во нашите испитувања се користени поликлонски ВЊБ серум, моноклонски серум 617/161 – специфичен за гулабови соеви, моноклонски серум *U85* – специфичен за класични соеви и моноклонски серум *7D4* – специфичен за соевите *F* и *La Sota* на вирусот на Њукастелската болест.

На микротитарска плоча со *V* дно, во сите дупчиња се диспензира изотоничен *PBS* (0,01 M), *pH* 7,0 – 7,2 во количина од 0,025 ml. Во првото дупче од секој ред се диспензира 0,025 ml на специфичен антисерум и се врши двократно разредување низ плочата, до крајот на редот. На овој начин се добива почетно разредување на специфичниот антисерум од 1:2 па сè до 1:4096. Потоа се додава инфективна алантоисна течност, разредена до 4 ХАЕ во количина од 0,025 ml во сите дупчиња. Плочата нежно се протресува и се инкубира на собна температура (околу 20 °C), за време од 30 минути. На крајот се врши додавање 1% суспензија на еритроцити, добиени од кокошки слободни од антитела на ЊБ во количина од 0,025 ml во сите дупчиња. Плочата нежно се протресува и се инкубира на собна температура (околу 20 °C), за време од 40 минути. По инкубацијата, плочата се закосува и се набљудува дали има појава на „солзење“ на еритроцитите. Највисокото разредување на специфичниот антисерум коешто дава комплетна ИХА на 4

ХАЕ на вирусот (појава на „солзење“), се смета за титар на ИХА. Во тестот се вклучени и контрола на еритроцитите (само PBS и еритроцити), позитивен контролен серум, негативен контролен серум и контрола на разредениот вирус до 4 ХАЕ.

4.2.5. Одредување интрацеребрален патоген индекс

Одредувањето на ИЦПИ се извршило во *OIE* и Националната референтна лабораторија за Њукастелска болест при Институтот Фридрих – Лефлер во Грајфсвалд, остров Римс – Германија, поради тоа што во Република Македонија воопшто не постојат услови за изведување на овој тест.

Свежа инфективна алантоисна течност со хемаглутинациски титар $>2^4$ (1:16) се разредува 1:10 со стерилен изотоничен физиолошки раствор, без додавање антибиотици или други адитиви. Количина од 0,05 ml на вака разредениот вирус се инјектира интрацеребрално во 10 *SPF* (specific pathogen free) пилиња, на старост помеѓу 24 и 40 часа. По инјектирањето, пилињата се проверуваат на секои 24 часа во период од 8 дена, и при секоја проверка се означуваат со 0 ако се здрави, 1 – болни и 2 – умрени. Умрените пилиња се означуваат со 2 до крајот на тестот. Интрацеребралниот патоген индекс се пресметува како средна вредност по птица и по проверка во текот на 8 дена.

4.2.6. Екстракција на вирусна рибонуклеинска киселина (РНК) од алантоисна течност

Екстракцијата на вирусната РНК од алантоисна течност е направена со кит за екстракција *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) и *Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit* (Invitex), во зависност од нивната достапност во моментот на испитување.

Екстракцијата на РНК со *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) е следна. На 140 µl супернатант од алантоисна течност се додаваат 560 µl *AVL* пуфер во којшто има носач на РНК, и мешавината се инкубира на собна температура (15 – 25 °C) за време од 10 минути и потоа се додаваат 560 µl на 96 – 100% етанол. Вака подготвениот раствор се префрлува во колонеста епруветичка (2 пати во еднакви количини), при што се врши центрифугирање од 1 минута на 8.000 вртежи во минута и исфрлување на исперената содржина. За перење на РНК се додаваат 500 µl пуфер *AW1*, претходно разреден со етанол,

се центрифугира 1 минута на 8.000 вртежи во минута и се исфрлува исперената содржина. Потоа се додаваат 500 μ l на пуфер *AW2*, претходно разреден со етанол, се инкубира 1 минута, се центрифугира 3 минути на 14.000 вртежи во минута и се исфрлува исперената содржина. По завршното сушење на колонестата епруветичка со центрифугирање 1 минута, на 14.000 вртежи во минута и префрлување на истата во епруветичка од 1,5 ml, се додаваат 60 μ l пуфер *AVE*, се инкубира 1 минута и се центрифугира 1 минута на 8.000 вртежи во минута, со што се врши елуција на РНК. Вака прочистената РНК е подготвена за полимеразна верижна реакција.

Екстракцијата на РНК со *Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit* (Invitex) е следна. На 200 ml супернатант од алантоисна течност се додаваат 600 μ l пуфер за лизирање. На оваа мешавина се додаваат по 20 μ l на протеиназа К и носач на РНК, се меша на вортекс и се инкубира 10 минути на 65 $^{\circ}$ C. Се додаваат 400 μ l на раствор за врзување на РНК и целата мешавина се префрлува во колонеста епруветичка со последично центрифугирање и исфрлување на исперената содржина. Во постапката на перење на РНК се додаваат по 600 μ l на пуфер за перење 1 и пуфер за перење 2, со последично центрифугирање и исфрлување на исперената содржина. На крајот, колонестата епруветичка се става во чиста епруветичка со капацитет од 1,5 ml, и за да се изврши елуција на РНК, се додаваат 40 μ l пуфер за елуција (претходно загреан на 80 $^{\circ}$ C) на мембраната на епруветичката, се инкубира 1 минута и се центрифугира 1 минута на 8.000 вртежи во минута. Вака прочистената РНК е подготвена за полимеразна верижна реакција.

4.2.7. Екстракција на вирусна РНК од хомогенати од органи

Екстракцијата на вирусната РНК од хомогенат од органи е направена со кит за екстракција *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) и *Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit* (Invitex), во зависност од нивната достапност во моментот на испитување. Екстракцијата на РНК со *Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit* (Invitex) е опишана во делот 4.2.8., со тоа што наместо алантоисна течност е користен супернатант од хомогенат од органи.

Екстракцијата на РНК со *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) е следна. Во 400 μ l на супернатант од хомогенат од органи се додаваат 300 μ l на пуфер за лизирање *RLT*, и мешавината се инкубира на собна температура (15 – 25 $^{\circ}$ C) за време од 15 минути и потоа

се додаваат 700 µl на 70% етанол. Вака подготвениот раствор се префрлува во колонеста епруветичка (2 пати во еднакви количини), при што се врши центрифугирање од 30 секунди на 13.000 вртежи во минута и исфрлување на исперената содржина. За перење на РНК се додаваат 700 µl пуфер *RW1*, се центрифугира 30 секунди на 13.000 вртежи во минута и се исфрлува исперената содржина. Потоа се додаваат 500 µl на пуфер *RPE*, се центрифугира 30 секунди на 13.000 вртежи во минута и се исфрлува исперената содржина. Овој чекор се повторува уште еднаш. По завршното сушење на колонестата епруветичка со центрифугирање 2 минути на 13.000 вртежи во минута и префрлување на истата во епруветичка од 1,5 ml, се додаваат 50 µl вода, слободна од РНК-ази, се центрифугира 30 секунди на 13.000 вртежи во минута, со што се врши елуција на РНК. Вака прочистената РНК е подготвена за полимеразна верижна реакција.

4.2.8. Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време во еден чекор за детекција на матрикс ген

Полимеразната верижна реакција во реално време во еден чекор се изврши со *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen) и со *iScript One-Step RT-PCR Kit for Probes* (Bio-Rad), во зависност од нивната достапност во моментот на испитување со 'прајмери' и хидролизирачка проба според *Wise et al.* ^[185]. Вкупната количина на мешавината изнесува 20 µl и со двата кита, со тоа што кај првиот кит таа е во следниот состав: *5xQiagen Istep RT PCR buffer* – 5 µl, *Qiagen dNTP Mix* – 0,80 µl, *MgCl₂ (25 mM)* – 1,25 µl, *Qiagen Istep RT PCR enzyme mix* – 1 микролитар, преден 'прајмер' М+4100 5'-*AGTGATGTGCTCGGACCTTC*-3' – 0,10 µl, заден 'прајмер' М-4220 5'-*CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA*-3' – 0,10 µl, хидролизирачка проба М+4169 5'-*[FAM]TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[TAMRA]* - 3' – 0,06 µl и вода до 20 µl, додека кај вториот кит таа е во следниот состав: *2x RT PCR reaction mix for probes* – 12,5 µl, *25 RT PCR Enzyme Mix* – 0,50 µl, преден 'прајмер' М+4100 5'-*AGTGATGTGCTCGGACCTTC*-3' – 0,13 µl, заден 'прајмер' М-4220 5'-*CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA*-3' – 0,13 µl, хидролизирачка проба М+4169 5'-*[FAM]TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[TAMRA]* - 3' – 0,05 µl и вода до 20 µl. На оваа мешавина се додаваат 5 µl на проба (екстрахирана РНК од деловите 4.2.8. и 4.2.9.) и епруветичките се ставаат во апарат за *qPCR iCycler iQ5 PCR*

Thermal Cycler (Bio-Rad) на следниве топлотни протоколи: 30 минути на 50 °C за реверзна транскрипција, 15 минути на 95 °C за инактивација на реверзната транскрипција и 40 циклуси на 94 °C, 10 секунди за денатурација, 52 °C – 30 секунди за прилепување и 72 °C – 10 секунди за екстензија за *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen) според *Wise et al.* (2004) и 50 °C – 10 минути, 95 °C – 5 минути и 40 циклуси на 95 °C – 10 секунди и 55 °C – 30 секунди за *iScript One-Step RT-PCR Kit for Probes* (Bio-Rad) според упатството на производителот.

4.2.9. Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време во еден чекор за детекција на фузиски ген

Постапката за детекција на Φ генот е иста како што е опишана во претходниот дел 3.2.8., освен користените 'прајмери' и хидролизирачката проба коишто се преден 'прајмер' F+4839 5'-TCCGGAGGATACAAGGGTCT-3', заден 'прајмер' F-4939 5'-AGCTGTTGCAACCCCAAG-3' и хидролизирачка проба F+4894 (VFP-1) 5'-[FAM]AAGCGTTTCTGTCTCCTTCCTCCA[TAMRA]-3' и температурата на прилепување на 'прајмерите' наместо 55 °C изнесува 58 °C, според *Wise et al.* [185].

4.2.10. Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во два чекора

Реверзната транскрипција и полимеразната верижна реакција во два чекора (RT-PCR) се изведе по протокол според *Aldous et al.* [5], со којшто се добиваат ампликони од 700 БП. Во чекорот на реверзна транскрипција не се користат универзални 'прајмери', туку само преден 'прајмер'. Количината на комплементарна ДНК (кДНК) во завршната реакција изнесува 10%, во нашиот случај се користени 2,5 μ l на кДНК во 25 μ l на завршна реакција.

Реверзна транскрипција – подготовка на комплементарна ДНК

Подготовката на кДНК се изведе со *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen), при што во првиот чекор се врши елиминација на геномска ДНК со додавање 2 μl *gDNA wipeout buffer 2x* во 12 μl на проба (екстрахирана РНК) и инкубација од 5 минути на 42 $^{\circ}\text{C}$. По истекот на ова време, пробата веднаш се става на мраз и се додава 1 микролитар ензим *QuantiTect Reverse Transcriptase*, 4 μl *Quantiscript RT buffer 5X*, 0,8 μl преден 'прајмер' *MSF1 5'-GACCGCTGACCACGAGGTTA-3'* (20 pmol/ μl) и вода до 20 μl . Вака подготвената мешавина се инкубира 60 минути на 42 $^{\circ}\text{C}$ и 3 минути на 95 $^{\circ}\text{C}$.

Полимеразна верижна реакција

Вториот чекор, т.е. полимеразна верижна реакција се изведе со *Taq PCR Master Mix Kit* (Qiagen) со додавање на 2,5 μl на кДНК во 22,5 μl мешавина, којашто се состои од: 12,5 μl *Taq Mastermix*, 1,25 μl преден 'прајмер' *MSF1 5'-GACCGCTGACCACGAGGTTA-3'* (20 pmol/ μl), 1,25 μl заден 'прајмер' *#2 5'-AGTCGGAGGATGTTGGCAGC-3'* (20 pmol/ μl) и вода до 22,5 μl . Вака подготвената мешавина се подложува на топлотен протокол 94 $^{\circ}\text{C}$ – 3 минути, 42 циклуси на 94 $^{\circ}\text{C}$ – 1 минута, 50 $^{\circ}\text{C}$ – 1 минута и 72 $^{\circ}\text{C}$ – 3 минути и завршна елонгација на 72 $^{\circ}\text{C}$ – 10 минути во апарат за *PCR TC 412* (Techne). Користените 'прајмери' овозможуваат добивање производ со големина од 700 БП.

4.2.11. Електрофореза на гел

Добиениот производ од полимеразната верижна реакција од делот 4.2.11.2. се става на гел, којшто е добиен со додавање 1,5 % w/v агароза (Agarose, LE, Analytical Grade, Promega) во соодветна количина на *TAE* пуфер (во зависност од големината на кадикката во којашто се врши електрофорезата), се врши негово загревање и потоа се додава 1% v/v етидиум бромид. По излевање на оладениот гел во кадикката за електрофореза, во секое дупче се става 15 μl *PCR* производ (добиен во делот 4.2.11.2), помешан со 3 μl *loading dye* (GelPilot, Qiagen). При секое пуштање на електрофорезата заедно со пробите се става и 12 μl на маркер (GeneRuler 100 БП, Thermo Scientific), со чијашто помош се одредува

големината на ампликоните на секои 100 БП. Електрофорезата се одвива на јачина на струјата од 80 V за време од 60 минути во апаратот *PowerPac Basic* (Bio-Rad). По завршувањето на електрофорезата, гелот се отчитува под осветлување со УВ-зраци на трансилуминатор *GenoView* (VWR), и се документира и обработува со *Canon EOS 1000 D*.

4.2.12. Прочистување на производот од полимеразната верижна реакција од гел

Производите од полимеразната верижна реакција коишто дадоа специфичен сигнал на агарозен гел при осветлување со УВ-зраци, со големина соодветна за користените 'прајмери' (700 БП), беа подложни на постапка на прочистување. Постапката има за цел ефикасно да ја прочисти ДНК од разни нечистотии, со цел да се изведе реакција на секвенционирање на конкретниот ген или дел од генот. Прочистување на производот од полимеразната верижна реакција од гел е извршен со *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). На почетокот се врши мерење на тежината на гелот, со цел да се додадат 3 волумени пуфер *QG* на 1 волумен гел. Мешавината се инкубира на 50 °C за време од 10 минути, со цел целосно да се растопи гелот. За да се врзе ДНК, мешавината се става во колонеста епруветичка и се центрифугира 1 минута на 8.000 вртежи во минута. Исперената содржина на дното на епруветичката се исфрла, се додаваат 500 ml пуфер *QG* и се центрифугира 1 минута на 8.000 вртежи во минута. За да се испере ДНК се додаваат 750 ml пуфер *PE* во истата епруветичка и се центрифугира 1 минута на 8.000 вртежи во минута, по претходна инкубација од 3 минути. Исперената содржина на дното на епруветичката се исфрла и се центрифугира 1 минута на 13.000 вртежи во минута, со цел целосно да се исуши ДНК. За да се изврши елуција на ДНК, колонестата епруветичка се става во обична епруветичка со капацитет од 1,5 ml, се додаваат 40 ml пуфер *EB* точно на мембраната на епруветичката, се инкубира 1 минута и се центрифугира 1 минута на 8.000 вртежи во минута. Вака прочистената ДНК е подготвена за реакција на секвенционирање.

4.2.13. Секвенционирање на производот од полимеразната верижна реакција

Реакција на секвенционирање

Реакцијата на секвенционирање е вршена со *Big Dye Terminator v3.1* кит (Applied Biosystems), со 'прајмери' според *Aldous et al.* [5], и тоа: преден 'прајмер' #7 5'-GACCGCTGACCACGAGGTTA-3' (10 pmol/μl) и заден 'прајмер' #2 5'-TTAGAAAAACACGGGTAGAA-3' (10 pmol/μl), со подготовка на реакциската мешавина во следните варијанти. Варијанта 1: *Ready Reaction Premix* 2,5x 4 ml, *Big Dye Sequencing Buffer* 5x 2 ml, 'прајмер' 0,4 ml, ДНК примерок 2 ml и вода до 20 ml. Термалниот протокол за варијанта 1 беше 96 °C за 5 минути како почетна денатурација, 25 циклуси на 96 °C за 10 секунди, 50 °C за 5 секунди и 60 °C за 4 минути. Варијанта 2: *Ready Reaction Premix* 2,5x 4 ml, *Big Dye Sequencing Buffer* 5x 2 ml, 'прајмер' 0,4 ml, ДНК примерок 8 ml и вода до 20 ml. Термалниот протокол за варијанта 2 беше 96 °C за 5 минути како почетна денатурација, 30 циклуси на 96 °C за 10 секунди, 50 °C за 5 секунди и 60 °C за 4 минути. Варијанта 3: *Ready Reaction Premix* 2,5x 4 ml, *Big Dye Sequencing Buffer* 5x 2 ml, 'прајмер' 0,4 ml и ДНК примерок 13,6 ml. Термалниот протокол за варијанта 3 беше 96 °C за 5 минути како почетна денатурација, 30 циклуси на 96 °C за 20 секунди, 50 °C за 20 секунди и 60 °C за 4 минути. Варијантите 2 и 3 се применуваа во случаи кога со варијанта 1 не можеше да се добие доволно читлива секвенција.

На ваков начин се добива секвенција во должина од 374 нуклеотиди од позиција 47 – 420, којашто го опфаќа МР на Ф генот. Аминокиселинската секвенција на МР на Ф протеинот е главен одлучувачки фактор за вируленцијата на ВЊБ [130, 132]. Врз основа на нуклеотидната секвенција на овој фрагмент, може да се направи брза патотипизација на вирусот [5, 49], како и веродостојно да се одреди неговото филогенетско потекло [5]. Оваа секвенција во научната јавност се користи за молекуларна и филогенетска карактеризација на соеви од различни делови од светот [5, 46, 104, 114, 154, 176, 177, 178, 182].

Прочистување на производот од реакцијата на секвенционирање

Во производот добиен по реакцијата на секвенционирање се става по 50 μl етанол (96 – 100%), 2 μl 3М натриум-ацетат (CH_3COONa), 2 μl 125 mM *EDTA*. Следува 15-минутна инкубација на собна температура, а потоа 30 минути центрифугирање на 12.000 вртежи во минута. Супернатантот се истура на филтер-хартија, се става 70% етанол, од прилика до цртката што означува врв на тубичката, и се центрифугира 15 минути на 12.000 вртежи во минута. Тубичката се декантира на филтер-хартија, внимавајќи да не се изгуби пелетот, и максимум 5 мин. се сушат во 'термосајклерот' на 50 $^{\circ}\text{C}$ со отворен капак или на собна температура, за целосно да се исушат. Потоа се додава 20 μl формамид (се меша без меури), и се става 3 мин. на 95 $^{\circ}\text{C}$ за негова денатурација. Веднаш потоа се ставаат 2 минути на мраз и целата содржина се префрла во соодветна тубичка.

Капиларна електрофореза во секвенционер

Прочистениот производ од реакцијата на секвенционирање е анализиран со капиларна електрофореза во машината за секвенционирање, со една капилара *ABI PRISM 310 Genetic analyzer* (Applied Biosystems). Користена е капилара од 47 см (Applied Biosystems), наполнета со *POP4* полимер (Applied Biosystems). За ракување со машината и добивање почетни необработени податоци беше користена програмата *310 Data Collection version 3.1.0.*, којшто беше наместен на *P4StdSeq* модулот, со којшто времето на инјектирање на пробата во капиларата е 30 секунди. Времетраењето на капиларната електрофореза за секоја проба беше 32 минути, при напон од 11,3 kV. Добиените почетни необработени податоци беа анализирани со програмата *Sequence Analysis version 5.3.1.*

4.2.14. Анализа на податоците од секвенционирањето

Анализата на нуклеотидните секвенции е направена со компјутерската програма *BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0*. Подредувањето на секвенциите е направено со методот *Clustal V*, со компјутерската програма *MEGA 5.10* според *Tamura et al.* ^[168] со којшто е направена и филогенетската анализа. Нуклеотидните секвенции беа подредени да започнуваат на стартниот кодон (ATG), на позицијата 47 на Φ генот и да завршуваат на базата 420, веднаш по местото на расекување на Φ генот. Филогенетските стебла се презентирани како „unrooted maximum likelihood“ модели, каде што должината на гранките е пропорционална на предвидениот број замени.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Анамнестички податоци, клинички знаци и патоанатомски наод предизвикани од страна на откриените вируси на ЊБ во Република Македонија (Табела 5.1.)

Ознака на сој	Анамнестички податоци, клинички знаци	Патоанатомски наод
NDV/chicken/Macedonia/082/2002	Несилки за конзумни јајца, старост 25 недели со целосно помината програма за вакцинација против ВЊБ, итна вакцинација по појавување на првите случаи, пад на несивост околу 50%, смртност околу 10%	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, egg peritonitis, proventriculitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/chicken/Macedonia/083/2003	Непознати	Непознати
NDV/chicken/Macedonia/080/2004	Непознати	Непознати
NDV/chicken/Macedonia/062/2005	Непознати	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, proventriculitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/chicken/Macedonia/069/2005	Масовни пцовисувања во цело село, апатија, пролив, „дремење“.	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, necrosis focalis lieni, proventriculitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica, cloacitis</i>
NDV/chicken/Macedonia/070/2005	Масовни пцовисувања во цело село, апатија, пролив, „дремење“.	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, necrosis focalis lieni, proventriculitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica, cloacitis</i>
NDV/chicken/Macedonia/421/2005	Несилки за конзумни јајца со целосно помината програма за вакцинација против NDV, пад на несивост, смртност	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, egg peritonitis, proventriculitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/starling/Macedonia/068/2006	Пронајдени 30 мртви птици.	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, congestio et oedema pulmoni, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/chicken/Macedonia/071/2006	Невакцинирани кокошки, во одгледувалиште вкупно 50 кокошки од кои 20 умрени, а 27 заболени.	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, proventriculitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica</i>

Табела 5.1. (продолжение)

Ознака на сој	Анамнестички податоци, клинички знаци	Патоанатомски наод
NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	Клинички знаци: пролив, слабеење, апатија, тортиколис	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	Појава на зголемена смртност*	<i>Tracheitis haemorrhagica, aerosacculitis, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	Појава на зголемена смртност*	<i>Tracheitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	Непознати	<i>Непознати</i>
NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	Непознати	<i>Tracheitis haemorrhagica, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	Итна вакцинација по појавување на првите случаи, во одгледувалиште вкупно 120 гулаби од кои 35 умрени, а 60 заболени. Клинички знаци: нестабилно движење, нестабилно летање, опистотонус. Терапирани со антибиотици.	<i>Laryngotracheitis haemorrhagica, hepatitis necroticans, enteritis haemorrhagica</i>
NDV/chicken/Macedonia/231/2010	Во одгледувалиште вкупно 40 пилиња од кои 5 умрени. Клинички знаци: инапетенца, раширени крилја, отежнато движење. Изолиран <i>Staphylococcus spp.</i> од белите дробови.	<i>Congestio et oedema pulmoni</i>
NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	Смртност во одгледувалиште со 100 гулаби. Клинички знаци: поткривнување, вкочанетост на нозете и крилата со отоци на зглобовите, слабеење	<i>Enteritis haemorrhagica</i>
NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	Појава на зголемена смртност	<i>Enteritis haemorrhagica</i>
NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	Ниска стапка на смртност во подолг временски период, наод на аскаридии во тенките црева	<i>Enteritis haemorrhagica</i>
NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	Ниска стапка на смртност кај постарите птици, значително повисока смртност кај младите птици, апатија, тортиколис, некоординирано движење	<i>Enteritis haemorrhagica, hyperemia meningi</i>
NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012	Пронајдена 1 (една) мртва птица	<i>Enteritis haemorrhagica</i>

* - исто одгледувалиште

Во табелата 5.1. се прикажани анамнестичките податоци, клиничките знаци и промените на внатрешните органи, утврдени при патоанатомскиот преглед во оние случаи каде беа познати. Најчестите патоанатомски промени, предизвикани од вирусите коишто се предмет на истражувањето, а што се јавуваат кај птиците, лоцирани се во дигестивниот и респираторниот систем, со тоа што кај гулабите и дивите птици отсутствуваат точкасти крвавења во преджелудникот. Лезиите на респираторниот систем се претежно лоцирани во горните дишни патишта. Кај живината којашто е во фаза на несење, забележани се и промени на јајчниците и јајцеводите, што резултира со перитонитис и излевање жолчна маса во градно-стомачната празнина. Само кај живината кај којашто е откриен сојот *NDV/chicken/Macedonia/231/2010*, не се забележани промени во дигестивниот систем туку само во респираторниот систем и тоа во белите дробови.



Слика 5.1. Крвавења во ларинкс и трахеја



Слика 5.2. Обилни крвавења во ларинкс и трахеја



Слика 5.3. Крвавења во преджелудник



Слика 5.4. Крвавења во преджелудник



Слика 5.5. Крвавења на лимфно ткиво во тенките црева



Слика 5.6. Крвавења на цекални тонзили



Слика 5.7. Воспаление на клоака



Слика 5.8. Конгестија на поткожно ткиво на глава

Слики 5.1. – 5.8. Патоанатомски промени кај живина, предизвикани од вирулентни класични соеви во Македонија

Во однос на клиничките знаци кај гулабите, претежно се јавуваат нервни знаци изразени како опистотонус, тортиколис и некоординирано движење со претежно пријавена ниска стапка на смртност, освен кај соевите *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007*, *NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007* и *NDV/pigeon/Macedonia/233/2011*.

Кај случаите на ЊБ кај селската живина, онаму каде што се познати клиничките знаци, се забележува висока смртност со пролив, генерална апатија и сомнолентност, освен кај селската живина кај којашто е откриен сојот *NDV/chicken/Macedonia/231/2010*, каде што се јавува ниска смртност со слични клинички знаци. Кај случаите на ЊБ кај фармската живина, смртноста е ниска, но има значителен пад на несивоста.

5.2. Резултати од изолација на вирусот на ембрионирани кокошкини јајца

Од вкупно 21 докажан сој на вирусот на Њукастелската болест, кај 5 примероци не можеше да се докаже присуството на вирусот по пат на негова изолација, т.е. по инокулација на хомогенатите од внатрешни органи на ембрионирани кокошкини јајца. По 3 пасажи, кај овие 5 примероци алантоисната течност не демонстрираше аглутинација на 1% и/или 5% суспензија на еритроцити, без предизвикана смртност на ембрионите. Кај овие 5 примероци е откриен вирусот на Њукастелската болест со молекуларни методи (*RT-qPCR* и *RT-PCR*). Кај останатите 16 примероци беше детектирана хемаглутиниращка активност на алантоисната течност по прва, втора или трета пасажа.

Табела 5.2. Присуство на вирус / детекција на хемаглутиниращка активност кај откриените соеви на вирусот на Њукастелската болест во Република Македонија

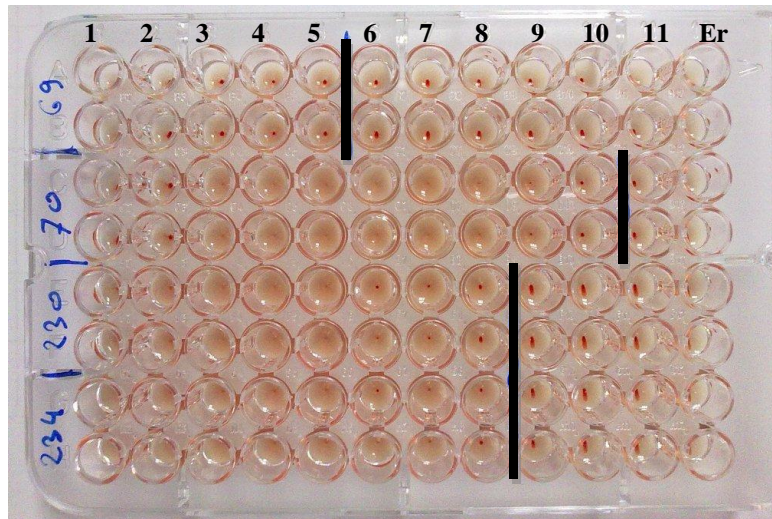
Реден број	Ознака на вирус	Присуство на жив вирус	Број на пасажа		
			Прва	Втора	Трета
1	NDV/chicken/Macedonia/082/2002	Не	Негативна	Негативна	Негативна
2	NDV/chicken/Macedonia/083/2003	Не	Негативна	Негативна	Негативна
3	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	Да	Позитивна	Позитивна	Позитивна
4	NDV/chicken/Macedonia/062/2005	Не	Негативна	Негативна	Негативна
5	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	Да	Позитивна	Позитивна	Позитивна
6	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	Да	Позитивна	Позитивна	Позитивна
7	NDV/chicken/Macedonia/421/2005	Да	Слабо позитивна	Позитивна	Позитивна
8	NDV/starling/Macedonia/068/2006	Не	Негативна	Негативна	Негативна
9	NDV/chicken/Macedonia/071/2006	Не	Негативна	Негативна	Негативна
10	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна
11	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна
12	NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	Да	Негативна	Негативна	Позитивна
13	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна
14	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна
15	NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна
16	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна
17	NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна
18	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	Да	Негативна	Слабо позитивна	Позитивна
19	NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	Да	Негативна	Слабо позитивна	Позитивна
20	NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна
21	NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012	Да	Негативна	Позитивна	Позитивна

5.3. Резултати од тестот на хемаглутинација на алантоисни течности

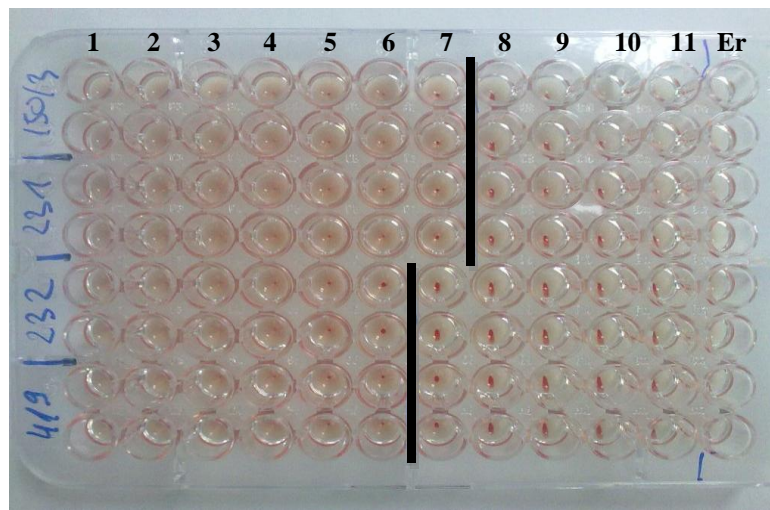
Алантоисните течности (вкупно 16) во коишто беше докажано присуството на вирусот, т.е. хемаглутиниращка активност на 1% и/или 5% суспензија на еритроцити, добиени од кокошки слободни од антитела против ЊБ (*на англ. specific antibody negative – SAN*), беа тестирани на присуство на хемаглутинација на микротитарска плоча, со цел да се одреди титарот на вирусот. Титарот на поединечните вируси на Њукастелската болест со тестот на хемаглутинација е прикажан во табела 5.3. Со секој тест се користеа и контроли опишани во делот 4.2.3. Тестот се сметаше за валиден само доколку сите контроли беа во ред. Највисокиот и најнискиот титар на хемаглутинација се јавуваат кај соевите откриени кај живината и тоа $1/1024$ ($\log_2 10$) и $1/32$ ($\log_2 5$) кај соевите *NDV/chicken/Macedonia/070/2005* и *NDV/chicken/Macedonia/069/2005*, соодветно. Кај соевите откриени кај гулабите, титарот на хемаглутинација се движи помеѓу $1/64$ ($\log_2 6$) и $1/256$ ($\log_2 8$).

Табела 5.3. Титар на хемаглутинација на поединечните вируси на Њукастелската болест кај коишто беше докажано присуство на вирус

Реден број	Ознака на вирус	Титар на хемаглутинација	
		двократно разредување	log ₂
1	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	1/128	7
2	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	1/32	5
3	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	1/1024	10
4	NDV/chicken/Macedonia/421/2005	1/128	7
5	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	1/256	8
6	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	1/64	6
7	NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	1/128	7
8	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	1/256	8
9	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	1/128	7
10	NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	1/64	6
11	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	1/128	7
12	NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	1/128	7
13	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	1/256	8
14	NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	1/128	7
15	NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	1/64	6
16	NDV/feralpigeon/Macedonia/9701/2012	1/64	6



Слика 5.9. Микротитарска плоча при тест на хемаглутинација: 69 – NDV/chicken/Macedonia/069/2005, 70 – NDV/chicken/Macedonia/070/2005; 230 – NDV/pigeon/Macedonia/230/2008; 234 – NDV/pigeon/Macedonia/234/2007



Слика 5.10. Микротитарска плоча при тест на хемаглутинација: 150/3 – NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007; 231 – NDV/chicken/Macedonia/231/2010; 232 – NDV/pigeon/Macedonia/232/2008; 419 – NDV/pigeon/Macedonia/419/2011

5.4. Резултати од тестот на инхибиција на хемаглутинација на алантоисни течности

Вирусите кај коишто беше одреден титарот на хемаглутинација, беа подложни на тест на инхибиција на хемаглутинација во 2 фази. Во првата фаза, тестот на инхибиција на хемаглутинација беше спроведен со поликлонски антисерум за ВЊБ и антисеруми специфични за поттиповите *H5N1* и *H7N1* на вирусот на авијарната инфлуенца (*AIV*), со цел да се разграничи дали причината за хемаглутинација на алантоисните течности е ВЊБ или *AIV*. Откако се утврди дека причината за хемаглутинација на алантоисните течности е ВЊБ, се пристапи кон втората фаза. Во втората фаза, тестот на инхибиција на хемаглутинација беше спроведен со моноклонски серуми, и тоа: *mAb 617/161* – специфичен за гулабови панзоотски соеви на вирусот на Њукастелската болест, *mAb U85* – специфичен за поголемиот број класични соеви на вирусот на Њукастелската болест и *mAb 7D4* – специфичен за соевите *F* и *La Sota* на вирусот на Њукастелската болест. Со секој тест се користеа и контроли опишани во делот 4.2.4. Тестот се сметаше за валиден само доколку сите контроли беа во ред.

Табела 5.4. Титар на инхибиција на хемаглутинација на поединечните вируси на Њукастелската болест, одреден со поликлонски антисерум за ВЊБ и антисеруми за H5N1 и H7N1 на вирусот на авијарната инфлуенца

Реден број	Ознака на вирус	Титар на инхибиција на хемаглутинација		
		Поликлонски антисерум ВЊБ (\log_2)	Антисерум H5N1 (\log_2)	Антисерум H7N1 (\log_2)
1	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	5	<2	<2
2	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	9	<2	<2
3	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	7	<2	<2
4	NDV/chicken/Macedonia/421/2005	6	<2	<2
5	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	5	<2	<2
6	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	4	<2	<2
7	NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	4	<2	<2
8	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	5	<2	<2
9	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	6	<2	<2
10	NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	4	<2	<2
11	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	8	<2	<2
12	NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	4	<2	<2
13	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	7	<2	<2
14	NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	8	<2	<2
15	NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	6	<2	<2
16	NDV/feralpigeon/Macedonia/9701/2012	8	<2	<2

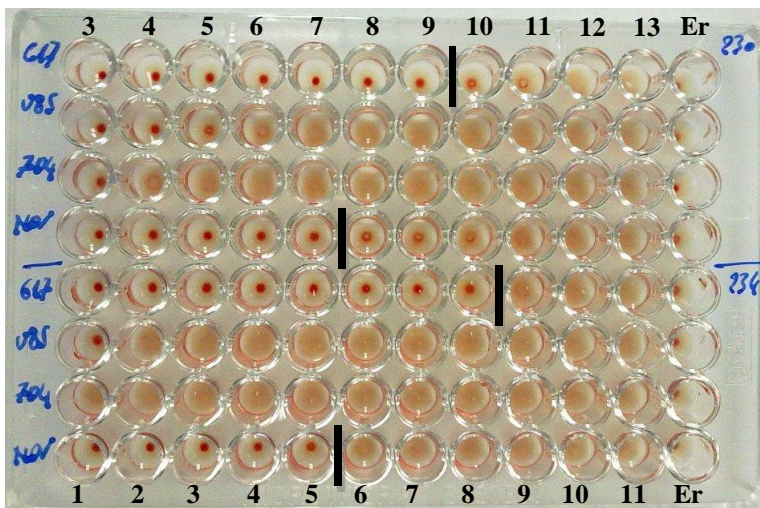
Од табела 5.4. може да се види дека сите испитувани соеви во тестот на инхибиција на хемаглутинација се негативни при користење специфични антисеруми за H5N1 и H7N1, додека пак се позитивни со поликлонски ВЊБ антисерум, т.е. способноста на вирусот (сојот) за хемаглутинација се инхибира од страна на поликлонскиот серум за ВЊБ. Титарот на инхибиција на хемаглутинација, изразен како реципрочна вредност од \log_2 , се движи од 4 кај соевите *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007*, *NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007*, *NDV/pigeon/Macedonia/962/2008* и *NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010* до 9 кај *NDV/chicken/Macedonia/069/2005*.

Табела 5.5. Титар на инхибиција на хемаглутинација на поединечните вируси на Њукастелската болест, одреден со моноклонски антисеруми

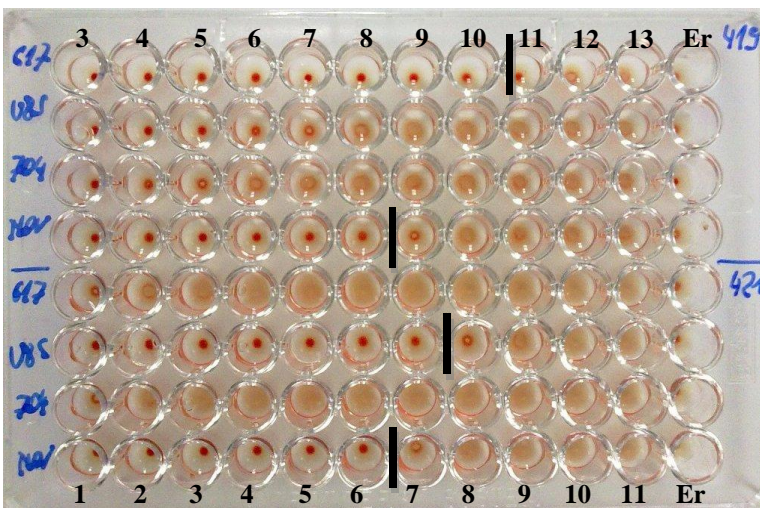
Реден број	Ознака на вирус	Титар на инхибиција на хемаглутинација		
		mAb 617/161 (log ₂)	mAb U85 (log ₂)	mAb 7D4 (log ₂)
1	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	<2	7	<2
2	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	<2	10	<2
3	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	<2	10	<2
4	NDV/chicken/Macedonia/421/2005	<2	9	<2
5	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	10	<2	<2
6	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	9	<2	<2
7	NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	10	<2	<2
8	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	10	<2	<2
9	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	9	<2	<2
10	NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	9	<2	<2
11	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	5	<2	<2
12	NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	9	<2	<2
13	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	8	<2	<2
14	NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	9	<2	<2
15	NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	11	<2	<2
16	NDV/feralpigeon/Macedonia/9701/2012	11	<2	<2

Од табела 5.5. може да се види дека сите испитувани соеви во тестот на инхибиција на хемаглутинација со *mAb 7D4*, специфичен за соевите *F* и *La Sota* на вирусот на Њукастелската болест се негативни. Инхибиција на хемаглутинација со *mAb U85*, специфичен за поголемиот број класични соеви на вирусот на Њукастелската болест, покажаа соевите *NDV/chicken/Macedonia/080/2004*, *NDV/chicken/Macedonia/069/2005*, *NDV/chicken/Macedonia/070/2005* и *NDV/chicken/Macedonia/421/2005*, додека инхибиција на хемаглутинација со *mAb 617/161*, специфичен за гулабови панзоотски соеви на вирусот на Њукастелската болест покажаа соевите: *NDV/pigeon/Macedonia/234/2007*, *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007*, *NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007*, *NDV/pigeon/Macedonia/230/2008*, *NDV/pigeon/Macedonia/232/2008*,

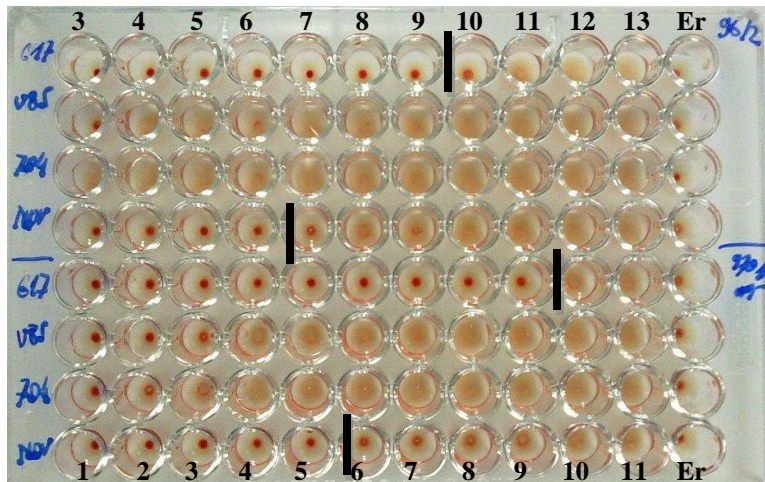
NDV/pigeon/Macedonia/962/2008, NDV/chicken/Macedonia/231/2010,
 NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010, NDV/pigeon/Macedonia/233/2011,
 NDV/pigeon/Macedonia/415/2011, NDV/pigeon/Macedonia/419/2011 и NDV/feral
 pigeon/Macedonia/9701/2012. Најнизок титар на инхибиција на хемаглутинација е
 забележан кај NDV/chicken/Macedonia/231/2010 $\log_2 5$, додека највисок титар на
 инхибиција на хемаглутинација е забележан кај NDV/pigeon/Macedonia/419/2011 и
 NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012 $\log_2 11$.



Слика 5.11.а



Слика 5.11.б



Слика 5.11.в

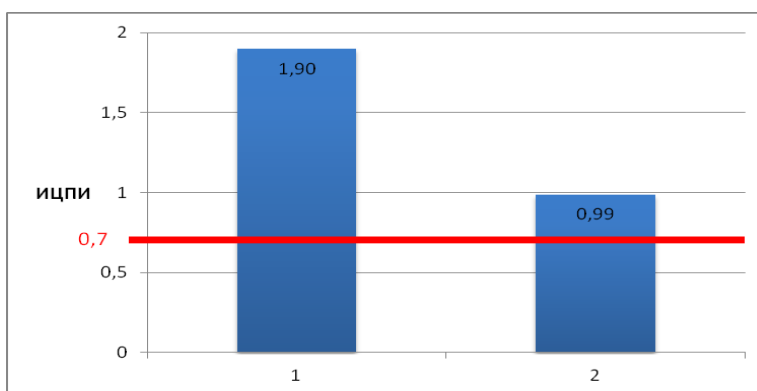
Слика 5.11. (а, б, в) Микротитарски плочи при тест на инхибиција на хемаглутинација: 230 – NDV/pigeon/Macedonia/230/2008; 234 – NDV/pigeon/Macedonia/234/2007; 419 – NDV/pigeon/Macedonia/419/2011; NDV/chicken/Macedonia/421/2005; 96/2 – NDV/pigeon/Macedonia/962/2008; 9701 – NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012. Моноклонските антитела 617/161, U85 и 7D4 се претходно разредени во почетно разредување од 1/8.

5.5. Резултати од тестот за одредување интрацеребрален патоген индекс

Одредувањето на интрацеребралниот патоген индекс беше извршено кај 10 соеви за коишто во моментот на праќање во Националната лабораторија за ЊБ при Институтот Фридрих – Лефлер во Грајфсвалд, остров Римс – Германија, беше познат статусот со помош на класични и молекуларни методи.

Табела 5.6. Вредности на интрацеребрален патоген индекс (ИЦПИ) кај поединечни соеви на Њукастелската болест

Реден број	Ознака на вирус	Вредност на ИЦПИ	Патотип
1	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	1,91	Велоген
2	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	1,90	Велоген
3	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	1,88	Велоген
4	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	0,96	Мезоген
5	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	1,53	Велоген
6	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	0,84	Мезоген
7	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	0,59	Лентоген
8	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	0,81	Мезоген
9	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	1,19	Мезоген

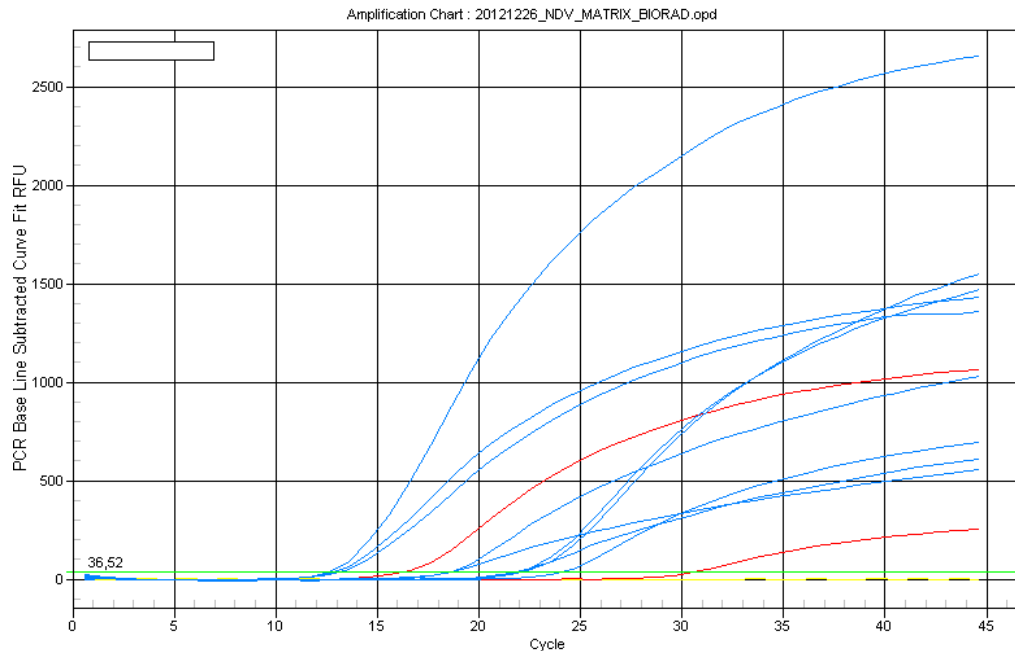


Графикон 5.1. Средни вредности на ИЦПИ кај 1 – класичните соеви на ND и 2 – гулабовите соеви на ND; со црвена линија е означена границата на вируленција 0,7.

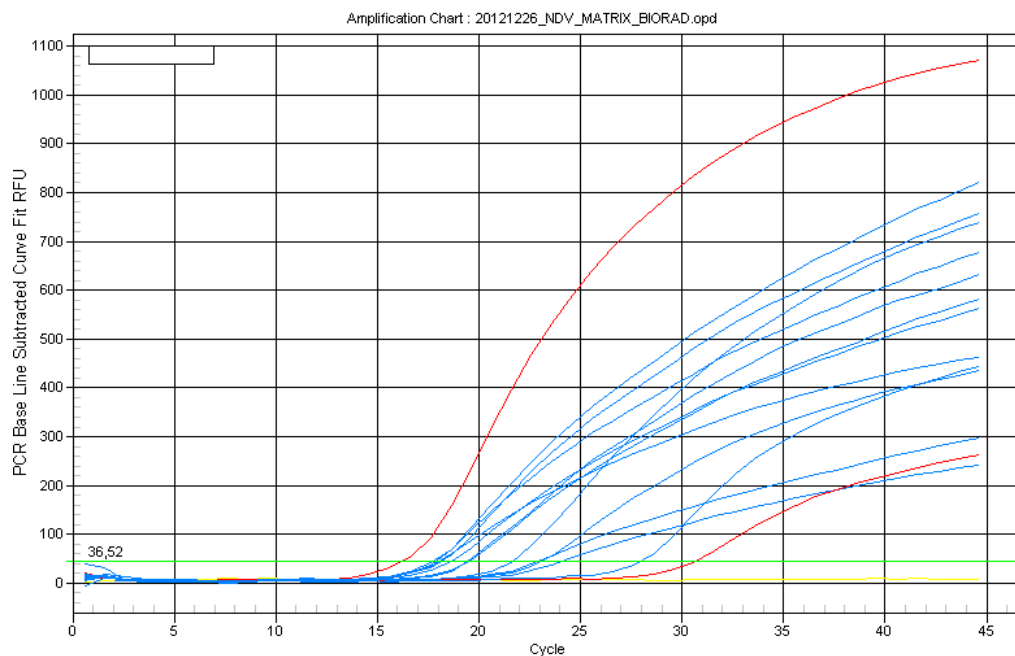
Од табелата 5.6. и графиконот 5.1. може да се види дека класичните соеви на ВЊБ имаат повисок ИЦПИ од гулабовите соеви на ВЊБ, така што кај класичните соеви тој во просек изнесува 1,90 и врз основа на оваа вредност тие спаѓаат во групата на велогени соеви, додека кај гулабовите соеви тој изнесува 0,96 и врз основа на оваа вредност тие спаѓаат во групата на мезогени соеви. Исклучок од гулабовите соеви прави единствено сојот *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007*, кај кого што ИЦПИ изнесува 1,53. Сојот *NDV/chicken/Macedonia/231/2010* иако е изолиран од живина, поседува ИЦПИ карактеристичен за гулабовите соеви на ВЊБ. Од сите испитувани соеви на ВЊБ, само сојот *NDV/pigeon/Macedonia/232/2008* поседува ИЦПИ помал од 0,7.

5.6. Резултати од реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време во еден чекор за детекција на матрикс ген на вирусот на Њукастелската болест

Тестот на *RT-qPCR* за детекција на М ген на ВЊБ беше спроведен според протоколот на *Wise et al.* ^[185], којшто е претходно детално опишан. Целта на тестот е да се утврди дали во испитуваните примероци има присуство на ВЊБ од класата II. Покрај испитуваните соеви, во тестот беа вклучени негативна контрола (контрола на екстракција на РНК), позитивна контрола *La Sota* (авирулентен сој) и слаба позитивна контрола (вирулентен сој), со циклус на квантификација (ЦК) помеѓу 30 и 35 циклус.



Слика 5.12. Приказ на амплификациските криви на класичните соеви на ЊБ со тестот на RT-qPCR за детекција на *M* ген – со црвена боја се означени позитивните контроли, со жолта боја е означена негативната контрола и со сина боја се означени испитуваните соеви.

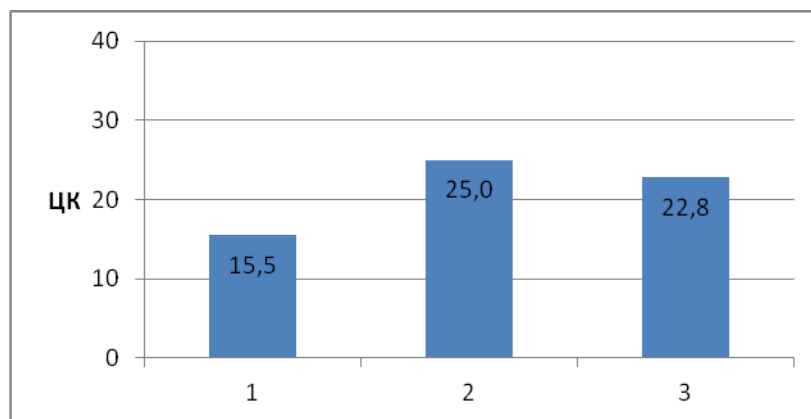


Слика 5.13. Приказ на амплификациските криви на гулабовите соеви на ЊБ со тестот на RT-qPCR за детекција на *M* ген – со црвена боја се означени позитивните контроли, со жолта боја е означена негативната контрола и со сина боја се означени испитуваните соеви.

Табела 5.7. Вредности на ЦК од RT-qPCR за детекција на М ген

Реден број	Ознака на вирус	ЦК вредности
1	NDV/chicken/Macedonia/082/2002*	25,6
2	NDV/chicken/Macedonia/083/2003*	23,6
3	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	13,7
4	NDV/chicken/Macedonia/062/2005*	28,7
5	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	14,4
6	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	14,1
7	NDV/chicken/Macedonia/421/2005	19,8
8	NDV/starling/Macedonia/068/2006*	23,7
9	NDV/chicken/Macedonia/071/2006*	23,3
10	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	20,0
11	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	19,3
12	NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	21,1
13	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	20,4
14	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	19,7
15	NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	23,2
16	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	21,3
17	NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	19,4
18	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	29,7
19	NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	28,3
20	NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	25,0
21	NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012	26,2

* – екстракцијата на РНК е вршена од клинички примероци



Графикон 5.2. Средна вредност на ЦК вредности кај испитуваните соеви; колонa 1 – класични соеви со екстракција на РНК од алантоисна течност, колонa 2 – класични соеви со екстракција на РНК од клинички примероци и колонa 3 – гулабови соеви со екстракција на РНК од алантоисна течност

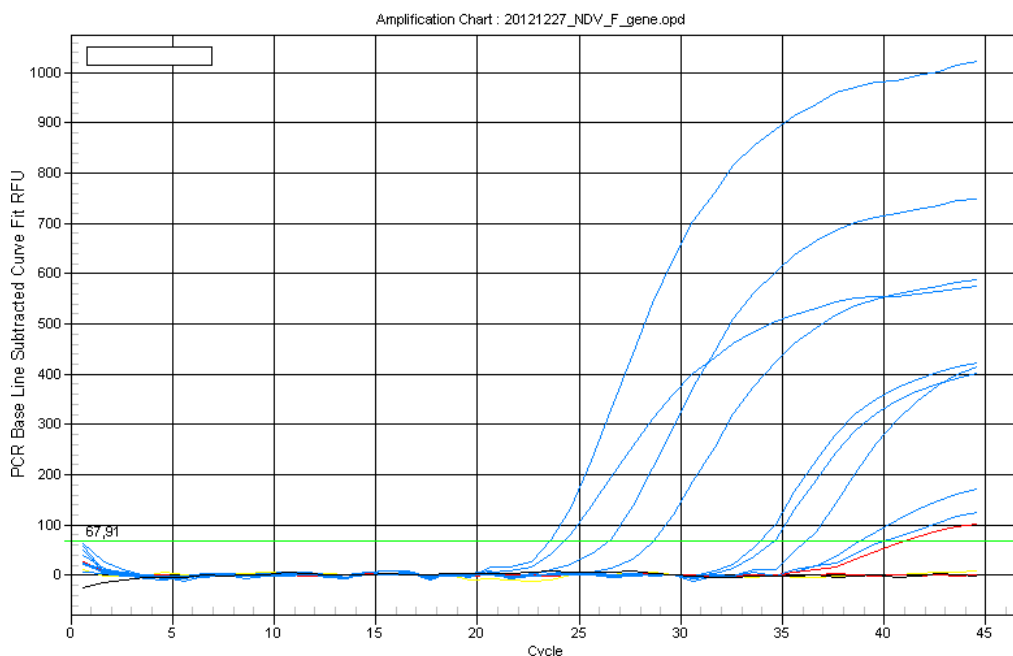
Покрај овој тест, сите примероци беа испитувани и на присуство на матрикс (М) ген на вирусот на авијарната инфлуенца со *RT-qPCR* и сите беа негативни.

Од сликите 5.12., 5.13. и табелата 5.7. може да се забележи дека сите испитувани соеви припаѓаат на класата II на вирусите на Њукастелската болест, без разлика на нивната вируленција. Негативната контрола (контрола на екстракција на РНК) е негативна додека позитивната авирулентна контрола (сој La Sota) и слабо позитивната вирулентна контрола се во рамките на очекуваните ЦК вредности. Вредностите на ЦК на испитуваните соеви во овој тест се движат од 13,7 до 28,3, при што најниски се кај класичните соеви кај коишто РНК е екстрахирана од алантоисна течност (15,5), највисоки се кај класичните соеви кај коишто РНК е екстрахирана од клинички примероци (25,0) и помеѓу нив се наоѓаат гулабовите соеви кај коишто РНК е екстрахирана од алантоисна течност (22,8) (графикон 5.2.).

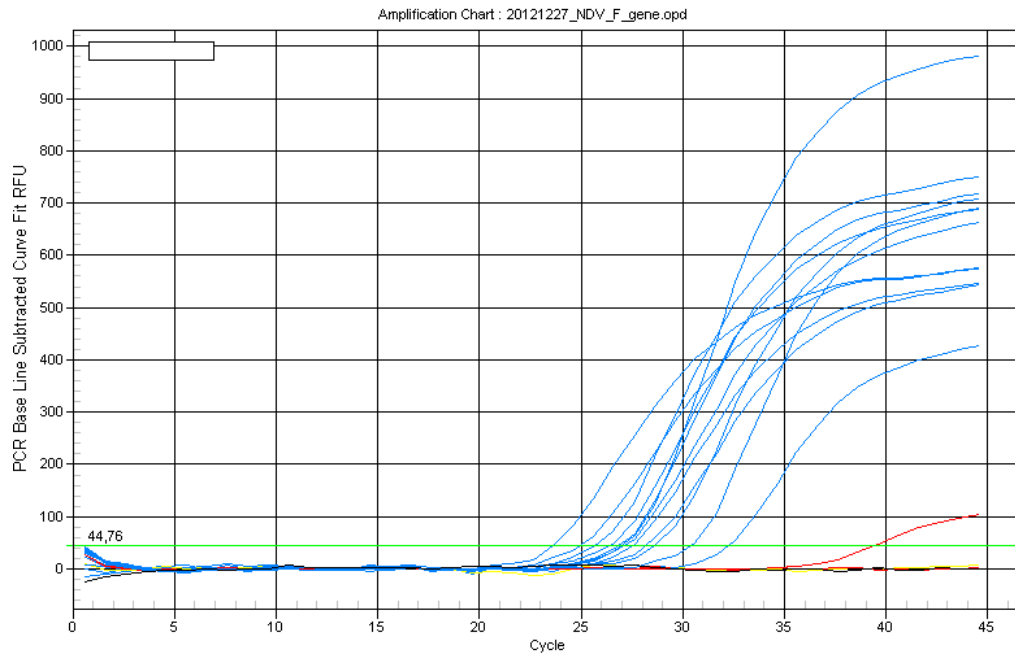
Лимитот на детекција на оваа метода, користејќи десеткратни сериски разредувања на вирусната суспензија на сојот *NDV/chicken/Macedonia/070/2005*, конзистентно изнесуваше $10^{1,3} EID_{50}/0,2ml$, што претставуваше задоволителна осетливост на тестот.

5.7. Резултати од реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време во еден чекор за детекција на фузиски ген на вирусот на Њукастелската болест

Тестот на *RT-qPCR* за детекција на Φ ген беше спроведен според протоколот на *Wise et al.* ^[185], којшто е претходно детално опишан. Целта на тестот е да се утврди дали во испитуваните примероци има присуство на велогени соеви на ВЊБ од класата II. Покрај испитуваните соеви, во тестот беа вклучени негативни контроли (контрола на 'mastermix' -от и контрола на екстракцијата на РНК), негативна контрола авирулентен сој (La Sota) и слаба позитивна контрола (вирулентен сој) со ЦК помеѓу 30 и 35 циклус.



Слика 5.14. Приказ на амплификациските криви на класичните соеви на ЊБ со тестот на *RT-qPCR* за детекција на Φ ген: со црвена боја се означени позитивните контроли; со жолта боја е означена негативната контрола; со црна боја е означена контролата без примерок и со сина боја се означени испитуваните соеви.

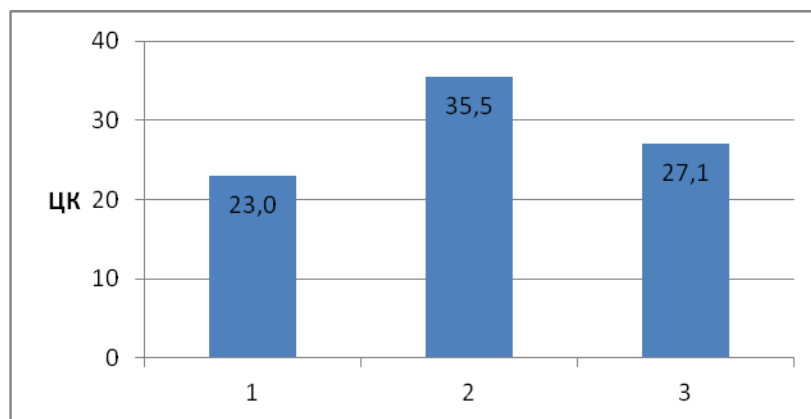


Слика 5.15. Приказ на амплификациските криви на гулабовите соеви на ЊБ со тестот на RT-qPCR за детекција на Φ ген; со црвена боја се означени позитивните контроли; со жолта боја е означена негативната контрола (контрола на екстракција на РНК); со црна боја е означена контролата без примерок (на англ. *no template control* (контрола на 'mastermix'-от)) и со сина боја се означени испитуваните соеви.

Табела 5.8. Вредности на ЦК од RT-qPCR за детекција на Ф ген

Реден број	Ознака на вирус	ЦК вредности
1	NDV/chicken/Macedonia/082/2002*	32,8
2	NDV/chicken/Macedonia/083/2003*	36,7
3	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	21,8
4	NDV/chicken/Macedonia/062/2005*	36,7
5	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	20,7
6	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	22,7
7	NDV/chicken/Macedonia/421/2005	26,8
8	NDV/starling/Macedonia/068/2006*	38,8
9	NDV/chicken/Macedonia/071/2006*	32,3
10	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	23,4
11	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	25,7
12	NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	25,8
13	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	25,5
14	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	24,4
15	NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	29,0
16	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	27,5
17	NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	24,8
18	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	34,7
19	NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	31,1
20	NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	26,9
21	NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012	26,2

* – екстракцијата на РНК е вршена од клинички примероци



Графикон 5.3. Средна вредност на ЦК вредности кај испитуваните соеви; колонa 1 – класични соеви со екстракција на РНК од алантоисна течност, колонa 2 – класични соеви со екстракција на РНК од клинички примероци и колонa 3 – гулабови соеви со екстракција на РНК од алантоисна течност

Од сликите 5.14., 5.15. и табелата 5.8. може да се забележи дека сите испитувани соеви припаѓаат на вирулентните соеви на класата II на вирусите на Њукастелската болест. Негативната контрола авирулентен сој (La Sota) во овој случај е негативна, како и негативните контроли (контрола на 'mastermix' и контрола на екстракцијата на РНК), додека слабо позитивната вирулентна контрола е во рамките на очекуваните ЦК вредности. Вредностите на ЦК во овој тест се повисоки од оние кај тестот за детекција на М ген, што е нормален наод и се движат од 20,7 до 36,7, при што најниски се кај класичните соеви кај коишто РНК е екстрахирана од алантоисна течност (23,0), највисоки се кај класичните соеви кај коишто РНК е екстрахирана од клинички примероци (35,5) и помеѓу нив се наоѓаат гулабовите соеви кај коишто РНК е екстрахирана од алантоисна течност (27,1) (графикон 5.3.).

Лимитот на детекција на оваа метода, користејќи десеткратни сериски разредувања на вирусната суспензија на сојот *NDV/chicken/Macedonia/070/2005*, конзистентно изнесуваше $10^{3,3} EID_{50}/0,2ml$, што претставуваше задоволителна осетливост на тестот.

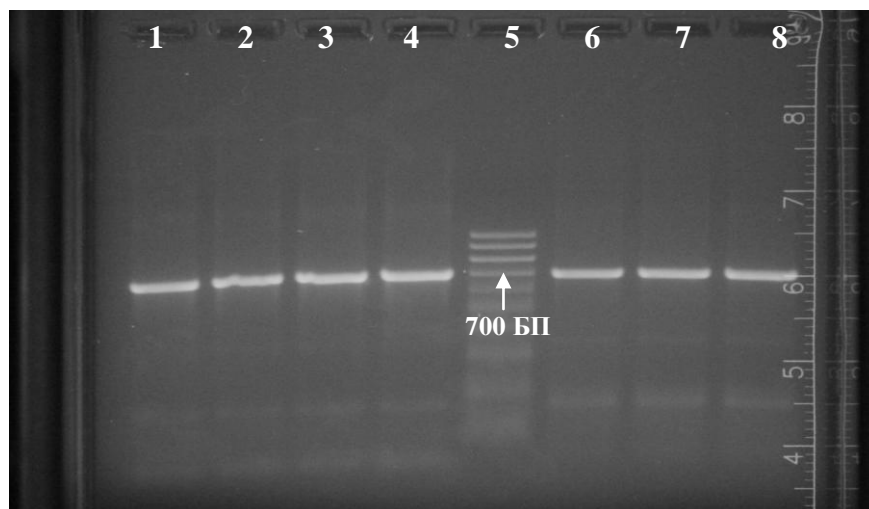
5.8. Резултати од реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во два чекора и електрофореза на гел

Откако е утврдено присуство на вирусна РНК кај испитуваните примероци со помош на *RT-qPCR* за детекција на М и Ф ген, екстрахираната РНК беше испитувана со тестот на *RT-PCR* и нанесување на производот (амплификатот) од оваа реакција на агарозен гел. Во првиот чекор е направена транскрипција на вирусната РНК во кДНК, а вториот чекор е реакцијата на *PCR*. Очекуваната големина на производот со користените 'прајмери' е околу 700 БП. Кај примероците кај коишто немаше видлив производ на агарозниот гел под УВ-зраци, се пристапи кон реамплификација на амплификатот од првата реакција со различен преден 'прајмер' ("semi-nested PCR"), при што очекуваната големина на производот во овој случај е околу 500 БП.

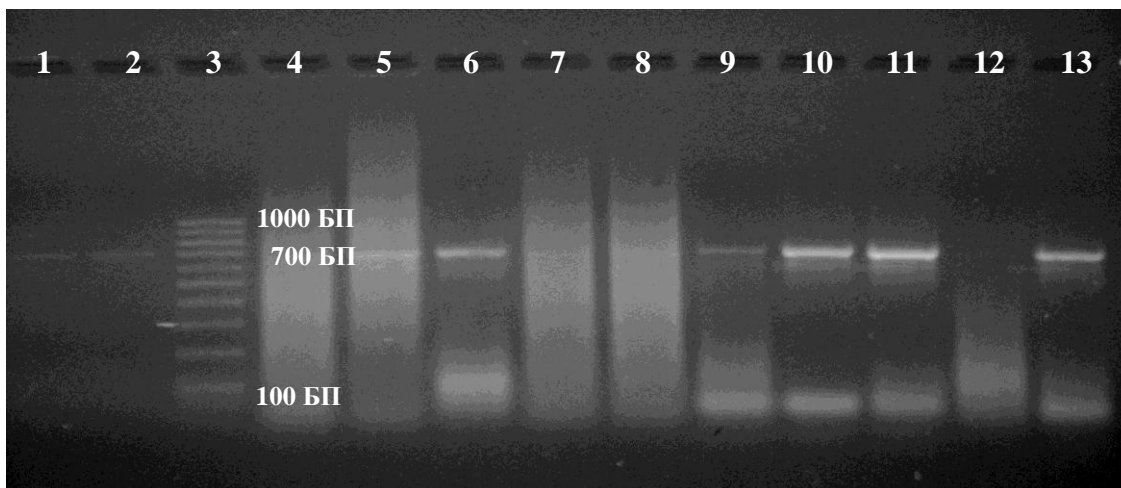
Табела 5.9. Големина на производ (БП) по реакција на RT-PCR и електрофореза на гел

Реден број	Ознака на вирус	Големина на производ (БП)
1	NDV/chicken/Macedonia/082/2002*	500
2	NDV/chicken/Macedonia/083/2003*	700
3	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	700
4	NDV/chicken/Macedonia/062/2005*	500
5	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	700
6	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	700
7	NDV/chicken/Macedonia/421/2005	700
8	NDV/starling/Macedonia/068/2006*	500
9	NDV/chicken/Macedonia/071/2006*	500
10	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	700
11	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	700
12	NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	700
13	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	700
14	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	700
15	NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	700
16	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	700
17	NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	700
18	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	700
19	NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	700
20	NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	700
21	NDV/feralpigeon/Macedonia/9701/2012	700

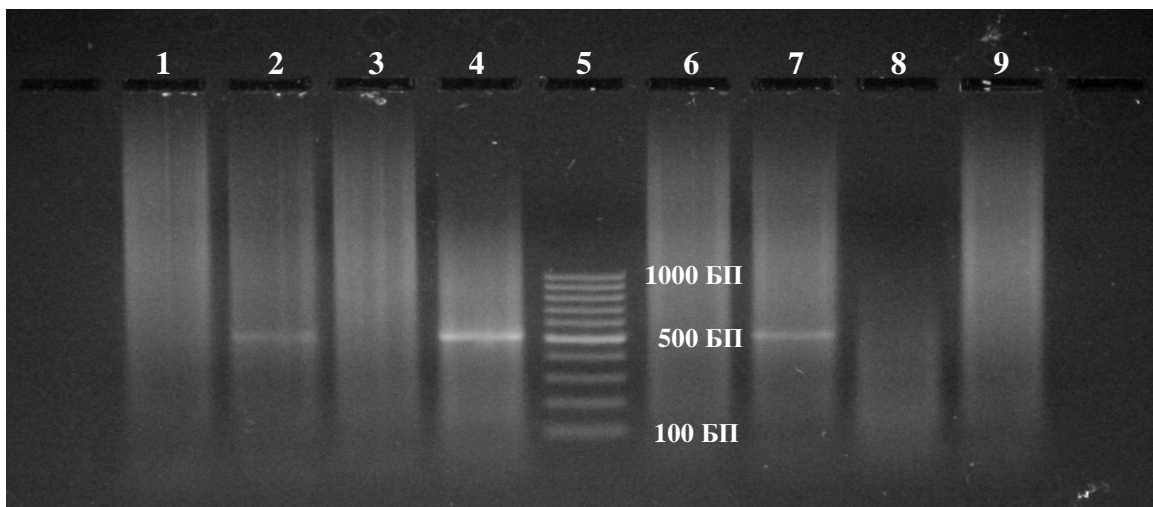
* – екстракцијата на РНК е вршена од клинички примероци



Слика 5.16. Визуелизација на PCR производи на гел, добиени со 'прајмери' MSF1 и #2 (Aldous et al., 2003), големина на производ 700 БП; 1 – NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007; 2 – NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007; 3 – NDV/pigeon/Macedonia/230/2008; 4 – NDV/pigeon/Macedonia/232/2008; 5 – маркер (100 – 1000 БП); 6 – NDV/chicken/Macedonia/069/2005; 7 – NDV/chicken/Macedonia/070/2005; 8 – NDV/chicken/Macedonia/421/2005



Слика 5.16. Визуелизација на PCR производи на гел, добиени со 'прајмери' MSF1 и #2 ^[5], големина на производ 700 БП; 1 – NDV/pigeon/Macedonia/233/2011 (прочистен продукт од гел); 2 – NDV/pigeon/Macedonia/234/2007 (прочистен продукт од гел); 3 – маркер (100 – 1000 БП); 4 – 055; 5 – NDV/chicken/Macedonia/083/2003; 6 – NDV/pigeon/Macedonia/415/2011; 7 – 064; 8 – NDV/chicken/Macedonia/071/2006; 9 – NDV/chicken/Macedonia/080/2005; 10 – NDV/chicken/Macedonia/070/2005; 11 – NDV/chicken/Macedonia/231/2010; 12 – NDV/chicken/Macedonia/082/2002; 13 – NDV/pigeon/Macedonia/234/2007

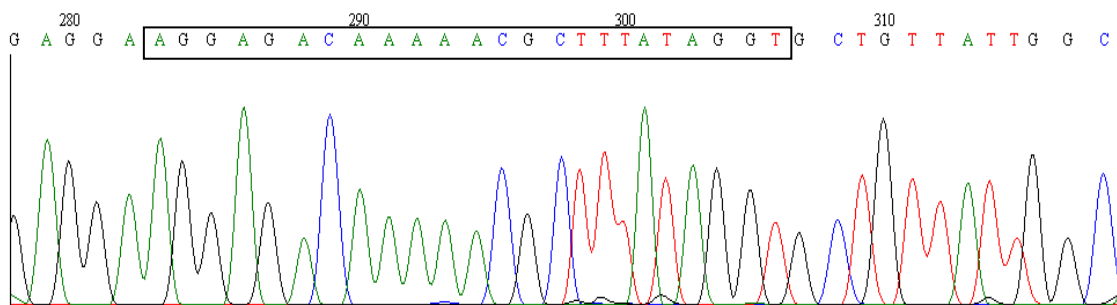


Слика 5.18. Визуелизација на RT-PCR производи на гел, добиени со 'прајмери' #7 и #2 ^[5], големина на производ 500 БП; 1 – 055, 2 – NDV/chicken/Macedonia/062/2005, 3 – 068, 4 – NDV/chicken/Macedonia/071/2006, 5 – маркер (100 – 1000 БП), 6 – 081, 7 – NDV/chicken/Macedonia/082/2002, 8 – 064, 9 – 077.

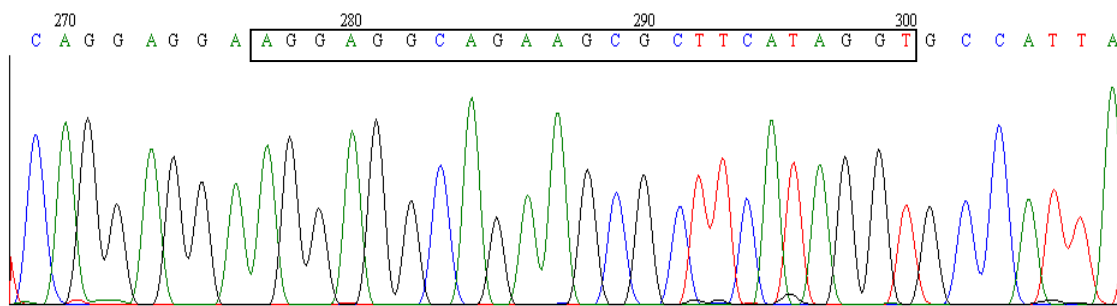
Од сликите 5.16. и 5.17. на коишто се прикажани дел од испитуваните соеви се забележува дека амплификатите добиени од соевите NDV/chicken/Macedonia/062/2005 (не е прикажан на слика 5.16.), NDV/chicken/Macedonia/071/2006 и NDV/chicken/Macedonia/082/2002 во RT-PCR во којшто се користени 'прајмери' MSF1 и #2 (големина на производот од 700 БП) се негативни, додека во „semi-nested PCR“ во којшто се користени 'прајмери' #7 и #2 (големина на производот од 500 БП) се позитивни. Мострите заведени под лабораториски број 055, 064 и 077 се негативни или мошне слабо позитивни на двата PCR, иако на RT-qPCR се позитивни. Од овие мостри не можеше да се изолира ниту жив вирус. На сликата 4.16. е очигледно дека од сојот NDV/starling/Macedonia/068/2006 не можеше да се добие видлив производ на гел, но подоцна со повторена екстракција и „semi-nested PCR“ се доби видлив производ од којшто успешно беше добиена секвенција на делот од Ф генот.

5.9. Резултати од секвенционирање

По добивањето видлив производ на гел, се пристапи кон прочистување на ДНК од гелот, *PCR* за секвенционирање, прочистување на производот од *PCR* за секвенционирање и негово ставање во капиларна електрофореза во секвенционер. Со користените 'прајмери' за секвенционирање, според *Aldous et al.* [5], се одреди нуклеотидниот / аминокиселинскиот распоред на секвенцијата на делот на Φ генот во должина од 374 нуклеотиди, т.е. од позиција 47 до 420, којашто го опфаќа и МР на Φ генот. Врз основа на нуклеотидната секвенција на местото на расекување и нејзиното преведување во аминокиселини, се одреди дали се работи за велоген / вирулентен или авирулентен сој.



Слика 5.19. Дел од хроматограм (BioEdit 7.0.9.0) на местото на расекување на Φ генот (означен со црна рамка) кај сојот NDV/chicken/Macedonia/070/2005.



Слика 5.20. Дел од хроматограм (BioEdit 7.0.9.0) на местото на расекување на Φ генот (означен со црна рамка) кај сојот NDV/pigeon/Macedonia/234/2007.

Табела 5.10. Вируленција на испитуваните соеви врз основа на аминокиселинскиот мотив на МР на Ф генот (Ф0 прекурсор).

Реден број	Ознака на вирус	Аминокиселински мотив на местото на сечење на Ф генот (Ф0 прекурсор)	Вируленција
1 – 21	Сите испитувани соеви во овој докторат	$^{112}RRQKR*FIG^{119}$	Вирулентен

Врз основа на добиените секвенции на делот на Ф генот, а особено на МР, се заклучи дека сите испитувани соеви се велогени, т.е. високовирулентни. Сите соеви иако се разликуваат во нуклеотидните секвенции, поседуваат ист аминокиселински мотив на местото на расекување на Ф генот $^{112}RRQKR*FIG^{119}$, којшто е карактеристичен за велогените соеви (табела 5.10.). Кај испитуваните соеви, нуклеотидната секвенција на МР на Ф генот е прикажана во табелата 5.11.

Табела 5.11. Нуклеотидна секвенција на МР на Ф генот (Ф0 прекурсор) кај испитуваните соеви; со долна црта се означени изменетите нуклеотиди

Ознака на вирус	Нуклеотидна секвенција на местото на сечење на Ф генот (Ф0 прекурсор) $^{112}RRQKR*FIG^{119}$
класични соеви на ВЊБ	$^{334}AGG-AGA-CAA-AAA-CGC-TTT-ATA-GGT^{357}$
гулабови соеви на ВЊБ	$^{334}AGG-AGG-CAG-AAG-CGC-TTC-ATA-GGT^{357}$
NDV/pigeon/Macedonia/419/2011 NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012	$^{334}AGG-AGG-CAG-AAG-CGC-TTT-ATA-GGT^{357}$

Соевите *NDV/pigeon/Macedonia/419/2011* и *NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012*, иако спаѓаат во групата на гулабови соеви, сепак поседуваат различна нуклеотидна секвенција на МР на Ф генот од сите останати гулабови соеви, испитувани во оваа дисертација.

Табела 5.12. Порамнување на нуклеотидните секвенци на делот на Φ генот од позиција nt 47 – 420 меѓу класичните соеви откриени во Македонија (врамени со црвена боја), со соеви од регионот и референтни соеви од секоја геногрупа.

#NDV/chicken/Macedonia/070/2005_VIIId	47	ATG	GGC	TCC	AAA	CCT	TCT	ACC	AGG	ATC	CCA	GCA	CCT	CTG	ATG	CTG	ATC	ACC	CGG	ATT	ATG	CCG	ATA	TTG	GGC	TGT	ATC	
#NDV/chicken/Macedonia/069/2005_VIIId	T..	
#NDV/chicken/Macedonia/062/2005_VIIId	
#NDV/chicken/Macedonia/421/2005_VIIId	...	A..G.	T.	
#NDV/chicken/Macedonia/080/2004_VIIIdG.	T.	..G	
#NDV/chicken/Macedonia/083/2003_VIIIdA	T	T.	...	A..	
#NDV/chicken/Macedonia/082/2002_VIIIdG.	T.	
#NDV/starling/Macedonia/068/2006_VIIId	
#NDV/chicken/Macedonia/071/2006_VIIIdT	
#BG_2437_07_4_Ruska_Biala_2007_VIIId	
#BG_470_09_814_CK_Kazatsite_2009_VIIIdG	A..	T..	..CC	...	T.	...	C.AC	...	
#BG_470_09_817_CK_Mamarchevo_2009_VIIIdC	A..	
#BG_7088_06_B1_Slanchogled_2006_VIIId
#Ch/99_VIIIdT	.C.	T.	T.	
#Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06_VIIId
#Chicken/Bulgaria_-_Dobrich/06_VIIId
#Chicken/Bulgaria_-_Rasgrad/06_VIIId	A..
#chicken/China/Guangxi11/2003_VIIIdATT	T.	...	A..	
#chicken/China/Guangxi7/2002_VIIIdC	..CTT	..T	..T	...	A..	
#China-G1F3-03_VIIIdG.	T.TTT	...	A..	
#Goose_paramyxovirus_SF02_VIIIdT	T.	
#CK/CH/JL/5/03_VIIIdAT	T.	...	A..	
#JS/5/01/Go_VIIIdG.	T.	..G	
#JSD0812_VIIIdCCC	...	T.	
#KAZ-342-03_VIIIdTTT	...	A..	
#KBNP-4152_VIIIdTCC	..T	...	A..	
#Muscovy_duck/China (Fujian)/FP1/02_VIIIdT	
#NA-1_VIIIdTTT	
#NDV/chicken/Kardam/2008_VIIIdT	
#NDV05-066_(DQ439921)_VIIIdG.	T.	
#SRB-2435-07_VIIId	A..	
#SRB-2387-07_VIIId	
#SRB-6764-06_VIIId	A..	
#SRB-7092-06_VIIId	
#SRB/1038/07/kobac_VIIId	A..	
#SRB/749/07/gugutka_VIIId	A..	
#SRB-7721-06_VIIId	A..	
#cockatoo/Indonesia/14698/90_VIIIdTATTA	A..	
#TW94P_VIIIdG	T.	...	G..	GG.TTC	..A	..CT	A..C	A..T	G..C	..G.	...	
#chicken/Sweden/97_VIIIdT	..CT	..A	G..TA	..C	..A	A..	..C	
#Siliistra/Popina/BG-31/96_VIIIdT	..CT	..A	G..TA	..C	..A	A..	..C	
#Sterna/Astr/2755/2001_VIIIdT	..T	..CT	..A	G..TA	..C	..A	A..	..C	G..	...	
#CZ3898-96_VIIIdT	..TTT	A..T	..C	
#HuB-1/91_VIIIdT	T.TTT	A..	..C	

#BG_470_09_817_CK_Mamarchevo_2009_VIIId	
#BG_7088_06_B1_Slanchogleed_2006VIIId	
#Ch/99_VIIId	
#Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06_VIIId	G	
#Chicken/Bulgaria_-_Dobrich/06_VIIId	
#Chicken/Bulgaria_-_Rasgrad/06_VIIId	
#chicken/China/Guangxi11/2003_VIIId	A	
#chicken/China/Guangxi7/2002_VIIId	
#China-G1F3-03_VIIId	C	
#Goose_paramyxovirus_SF02_VIIId	
#CK/CH/JL/5/03_VIIId	C	
#JS/5/01/Go_VIIId	A	
#JSD0812_VIIId	A	
#KAZ-342-03_VIIId	C	...	
#KBNP-4152_VIIId	
#Muscovy_duck/China(Fujian)/FP1/02_VIIId	
#NA-1_VIIId	C	...	
#NDV/chicken/Kardam/2008_VIIId	
#NDV05-066_VIIId	G	
#SRB-2435-07_VIIId	
#SRB-2387-07_VIIId	
#SRB-6764-06_VIIId	
#SRB-7092-06_VIIId	
#SRB/1038/07/kobac_VIIId	
#SRB/749/07/gugutka_VIIId	
#SRB-7721-06_VIIId	
#cockatoo/Indonesia/14698/90_VIIa	...	A	G	C	
#TW94P_VIIa	A	G	
#chicken/Sweden/97_VIIb	A	...	G	G	G	...	T	C	...	C	...	
#Siliistra/Popina/BG-31/96_VIIb	A	...	G	G	G	...	T	C	...	C	...	
#Sterna/Astr/2755/2001_VIIb	A	...	G	G	G	...	T	C	...	C	...	
#CZ3898-96_VIIc	A	G	C	
#HuB-1/91_VIIc	GG	C	
#JS-3/00_VIIc	A	...	G	C	
#TW-08-05_VIIe	C	
#JS/1/02/Du_IX	...	C	A	T	...	C	G	G	G	C	A	...	C	...	
#QH1_VIII	A	T	...	A	...	T	G	...	G	G	C	T	
#SRB-7625-09-golub_VI	A	...	A	...	G	G	G	C	A	...	A	
#HR-Zelina-94_V	...	C	A	T	...	A	G	G	...	C	A	...	C	...	
#Italien_IV	A	T	...	T	...	C	G	G	C	A	...	C	
#Mukteswar_III	A	T	...	A	...	C	G	G	C	A	
#La_Sota_II	A	T	...	A	G	G	...	G	G	G	C	...	C	A	...	
#chicken/N.Ireland.Ulster/67_I	A	T	...	A	G	...	A	...	G	G	C	...	C	A	...

Табела 5.13. Порамнување на аминокиселинските резидуи на делот на Φ генот од позиција nt 47 – 420 меѓу класичните соеви, откриени во Македонија (врамени со црвена боја), со соеви од регионот и референтни соеви од секоја геногрупа.

#NDV/chicken/Macedonia/070/2005_{VIId}	MGSKPSTRIP	APLMLITRIM	PILGCIRPTS	SLDGRPLAAA	GIVVTGDKAV	NVYTSSQTGS	IIVKLLPNMP	RDKEACAKAP
#NDV/chicken/Macedonia/069/2005_{VIId}S.....
#NDV/chicken/Macedonia/062/2005_{VIId}
#NDV/chicken/Macedonia/421/2005_{VIId}	.S.R.....	L.....
#NDV/chicken/Macedonia/080/2004_{VIId}	...R.....	LM.....
#NDV/chicken/Macedonia/083/2003_{VIId}	L.S..L..F.....
#NDV/chicken/Macedonia/082/2002_{VIId}	..R.....	L.....
#NDV/starling/Macedonia/068/2006_{VIId}
#NDV/chicken/Macedonia/071/2006_{VIId}
#BG_2437_07_4_Ruska_Biala_2007_{VIId}
#BG_470_09_814_CK_Kazatsite_2009_{VIId}	T.....WT.	L.....I.....
#BG_470_09_817_CK_Mamarchevo_2009_{VIId}T.....	..S.....
#BG_7088_06_B1_Slanchogled_2006_{VIId}
#Ch/99_{VIId}	...TS.....	L.....
#Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06_{VIId}I.....
#Chicken/Bulgaria_-_Dobrich/06_{VIId}
#Chicken/Bulgaria_-_Rasgrad/06_{VIId}S.....
#chicken/China/Guangxi11/2003_{VIId}I..	L.S..L..
#chicken/China/Guangxi7/2002_{VIId}PT.....L	L.S..L..G....R..
#China-G1F3-03_{VIId}	..RS.....	L.S..L..	K....R..
#Goose_paramyxovirus_SF02_{VIId}	L.....
#CK/CH/JL/5/03_{VIId}	L.S..L..
#JS/5/01/Go_{VIId}	..R.....	LM.....
#JSD0812_{VIId}T.....	L.....C.....R.....
#KAZ-342-03_{VIId}	L.S..L..	K....R..
#KBNP-4152_{VIId}T..T	L.S.....
#Muscovy_duck/China(Fujian)/FP1/02_{VIId}	L.....
#NA-1_{VIId}	L.....L..	K....R..
#NDV/chicken/Kardam/2008_{VIId}T
#NDV05-066_{VIId}	..RS.....I.....
#SRB-2435-07_{VIId}S.....
#SRB-2387-07_{VIId}
#SRB-6764-06_{VIId}S.....
#SRB-7092-06_{VIId}
#SRB/1038/07/kobac_{VIId}S.....
#SRB/749/07/gugutka_{VIId}S.....
#SRB-7721-06_{VIId}S.....
#cockatoo/Indonesia/14698/90_{VIIa}	V.....	L.S..CL..I.....	K.....
#TW94P_{VIIa}	...RS.A.G.	V.....I	.TISGSCL..I.....	K.....T.

#chicken/Sweden/97_{VIIb}	V.....V.	L..S...SI.I.....	K.....
#Silistra/Popina/BG-31/96_{VIIb}	V.....V.	L..S...S.I.....	K.....
#Sterna/Astr/2755/2001_{VIIb}	L V.....V.	L..S.V.S.I.....	K.....
#CZ3898-96_{VIIc}	L..S...C.A.I..I.....	K.....
#HuB-1/91_{VIIc}	VS.....	L..S...CL..I.....	K.....
#JS-3/00_{VIIc}	S.....	V.P.....	L..S...CLA.I.....	K.....
#TW-08-05_{VIIe}	PQTF.....	L.FS.T.LA.	K...G.....
#JS/1/02/Du_{IX}	P.S.NV.	TV..A	LA.S.V.L.NI.....	K.....
#QH1_{VIII}	S...FL	T.S.....	L..S...C..GI.....	K.....RT.
#SRB-7625-09-golub_{VI}	S...H....	.S.....T	LV.S..YS..I..I.....	K.....
#HR-Zelina-94_{V}	S V.....	T L..S...CL..I.....L	K.....
#Italien_{IV}	RS.....	V.....I..A	LT.S...L..I.....	K.....
#Mukteswar_{III}	PRS.....	V....TI..T	LA.SYV.L..I.....	K.....
#La_Sota_{II}	R...KN.	.M..TI.VA	LV.S..C.AN	.I.....	.I.....L	K.....
#chicken/N.Ireland.Ulster/67_{I}	RS.....	V....TV.VA	LE.S.VC...	TIS.....L	K....F.....
#NDV/chicken/Macedonia/070/2005_{VIIId}	LEAYNRTLTT	LLTPLGDSIR	KIQGSVSTSG	<u>GRRQKRF</u>	IGA	VIGS		
#NDV/chicken/Macedonia/069/2005_{VIIId}
#NDV/chicken/Macedonia/062/2005_{VIIId}
#NDV/chicken/Macedonia/421/2005_{VIIId}
#NDV/chicken/Macedonia/080/2004_{VIIId}	M..	I..
#NDV/chicken/Macedonia/083/2003_{VIIId}
#NDV/chicken/Macedonia/082/2002_{VIIId}
#NDV/starling/Macedonia/068/2006_{VIIId}
#NDV/chicken/Macedonia/071/2006_{VIIId}	M..
#BG_2437_07_4_Ruska_Biala_2007_{VIIId}	P..
#BG_470_09_814_CK_Kazatsite_2009_{VIIId}	E....P.
#BG_470_09_817_CK_Mamarchevo_2009_{VIIId}
#BG_7088_06_B1_Slanchogled_2006_{VIIId}
#Ch/99_{VIIId}
#Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06_{VIIId}
#Chicken/Bulgaria_-_Dobrich/06_{VIIId}
#Chicken/Bulgaria_-_Rasgrad/06_{VIIId}
#chicken/China/Guangxi11/2003_{VIIId}	R.....	R.....
#chicken/China/Guangxi7/2002_{VIIId}
#China-G1F3-03_{VIIId}
#Goose_paramyxovirus_SF02_{VIIId}
#CK/CH/JL/5/03_{VIIId}
#JS/5/01/Go_{VIIId}	I..
#JSD0812_{VIIId}
#KAZ-342-03_{VIIId}
#KBNP-4152_{VIIId}

#Muscovy_duck/China (Fujian)/FP1/02_{VIIId}A
#NA-1_{VIIId}
#NDV/chicken/Kardam/2008_{VIIId}
#NDV05-066_{VIIId}A.....
#SRB-2435-07_{VIIId}
#SRB-2387-07_{VIIId}K.....
#SRB-6764-06_{VIIId}
#SRB-7092-06_{VIIId}K.....
#SRB/1038/07/kobac_{VIIId}
#SRB/749/07/gugutka_{VIIId}
#SRB-7721-06_{VIIId}
#cockatoo/Indonesia/14698/90_{VIIa}
#TW94P_{VIIa}
#chicken/Sweden/97_{VIIb}	R.....R.....
#Silistra/Popina/BG-31/96_{VIIb}	R.....R.....
#Sterna/Astr/2755/2001_{VIIb}	R.....R.....
#CZ3898-96_{VIIc}
#HuB-1/91_{VIIc}R.....
#JS-3/00_{VIIc}K.....
#TW-08-05_{VIIe}A.....
#JS/1/02/Du_{IX}	R..E..AT...R.....	I...
#QH1_{VIII}	R.....T.....
#SRB-7625-09-golub_{VI}	R.....	I...
#HR-Zelina-94_{V}	R..E..AT...V..	I...
#Italien_{IV}N.....	R..E..T.....R.....	I...
#Mukteswar_{III}	R..E..T.....R.....	I...
#La_Sota_{II}D.....	R..E..T.....	.G..G..L...	I..G
#chicken/N.Ireland.Ulster/67_{I}	...F.....	W.....	R..E..T.....	.GK.G.L...	I..G

Табела 5.14. Порамнување на нуклеотидните секвенци на делот на Φ генот од позиција nt 47 – 420 меѓу гулабовите соеви откриени во Македонија (врамени со црвена боја), со соеви од регионот и референтни соеви од секоја геногрупа.

#NDV/pigeon/Macedonia/234/2007_{VIb}	47	ATG	GGC	TCC	AAA	CCC	CAC	ACC	AGG	ATC	CCG	GCA	CCT	CTG	ACG	CTG	ATC	ACT	CGA	ATC	ACT	CTG	GTA	CTG	AGC	TGC	ATC
#NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/230/2008_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/232/2008_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/962/2008_{VIb}
#NDV/chicken/Macedonia/231/2010_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/233/2011_{VIb}	T..
#NDV/pigeon/Macedonia/415/2011_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/419/2011_{VIb}	A..	..GT
#NDV/feral_pigeon/Macedonia/9701/2012_{VIb}	T..TA
#SRB-58-10-golub_{VIb}	A..	T..TA
#SRB-7625-09-golub_{VIb}	A..	T..TA
#PPMV-1/Belgium/11-09620/2011_{(JX901124)}_{VIb}	T..
#1168_84GB_pigeon_{VIb}T	TCTA	..TACCT	..TG	...	A..	..T
#Denmark/PDKPI95103_{(AY175755)}_{VIb}T	TC	G..A	..TC	..TCTG	...	A..	..T
#dove/Italy/2736/00_{(AY562989)}_{VIb}	TCTT	...	A..
#Germany/PDEPI94216_{(AY175753)}_{VIb}	TCTCT	...	A..
#HU-1114/90_{(AY2521200)}_{VIb}T	TCTTA	..TACC	..TG	...	A..	..T	..T
#HU-655/89_{(AY150120)}_{VIb}T	TCTA	..TACC	..TG	...	A..	..T
#Ireland/PIEPI96302_{(AY175757)}_{VIb}T	TCTA	..TACC	..TG	...	A..	..T
#IT-150/95_{(AY150145)}_{VIb}CTA	..TACC	..TG	...	A..T
#IT-152/96_{(AY150147)}_{VIb}T	TCTTA	..TT	..ACTG	...	A..	..T	..T
#IT-227/82_{(AJ880277)}_{VIb}T	TCTA	..TACC	..TG	...	A..	..T
#JS/07/16/Pi_{(FJ766527)}_{VIb}ATCT
#JS/2/98/Go_{(AF456439)}_{VIb}T	TCA	..TC	..TCTG	...	A..	..T
#PB9601_{VIb}G	..T	TCTA	..TC	..TCTG	...	A..	..T
#United_Kingdom/PUKPI89124_{(AY175768)}_{VIb}T	TCTTA	..TA	..TCC	..TG	...	A..	..T
#United_Kingdom/PUKPI99064_{(AY175770)}_{VIb}TATTT
#Israel70_{VIa}T	TCTA	..TA	..TCT	..TG	..T	A..	..TT
#H310-82_{(AF001112)}_{VIc}T	TCT	G..	..TA	..TT	..TC	..GG	..T	..A	..TT
#DK-1/95_{(AF001129)}_{VIId}TT	TCT	G..	..TA	..TC	..T	..ACG	..T	..A	..TT
#Sh-2/98_{(AF458017)}_{VIId}T	TCTTA	..TC	..T	..AC	..AG	..T	..A	..TT
#ZhJ-2/86_{(AF458016)}_{VIId}T	TCTTA	..TC	..T	..AC	..AG	..T	..A	..TT
#Wawrick_{(Z12111)}_{VIe}T	TCTA	..TTCT	..TG	..T	A..	..TT
#FJ/1/85/Ch_{(FJ436304)}_{IX}	C..T	TCTAT	G..	..ATC	..GTC	..A	..G	..T	..G	..GCT	G..
#QH1_{(FJ751918)}_{VIII}TT	TCTT	..TTA	..AC	..TC	..T	..TC	..G	..T	..TG	...	A..T	..T	...
#Chicken/Bulgaria_{-Burgas/06}_{VII}T	TCTATC	..G	..T	..TG	..C	..A	..T	..GT	...
#SRB-7092-06_{VII}T	TCTATC	..G	..T	..TG	..C	..A	..T	..GT	...
#China-G1F3-03_{VII}G	..T	TCTATG	..T	..TG	..T	..A	..TT
#HR-Zelina-94_{V}T	TCTT	..TA	..TT	..TAC	..G	..T	..GAT
#Italien_{(EU293914)}_{IV}G	..T	TCTTA	..TTCT	..GACT
#Mukteswar_{(EF201805)}_{III}	C..G	..T	TCTA	..TA	..TC	..TA	..GGCT	..AT	G..	
#France/EFPI99117_{(AY175702)}_{II}G	..T	TCTA	..A	..AA	..TCT	..TC	..G	..G	..GT	
#South_Africa/PZAPI99091_{(AY175774)}_{I}G	..T	TCTA	..TTC	..GTC	..G	..G	..G	..GCT	...	G..	

#NDV/pigeon/Macedonia/234/2007_{VIb}	125	TGC	TCG	ACG	AGC	TCT	CTT	GAC	GGC	AGG	CCA	CTT	GCA	GCT	GCG	GGG	ATT	GTG	GTA	ACA	GGA	GAT	AAA	GCA	ATC	AAT	ATA
#NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/230/2008_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/232/2008_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/962/2008_{VIb}
#NDV/chicken/Macedonia/231/2010_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010_{VIb}	C..
#NDV/pigeon/Macedonia/233/2011_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/415/2011_{VIb}	.A.C
#NDV/pigeon/Macedonia/419/2011_{VIb}
#NDV/feral_pigeon/Macedonia/9701/2012_{VIb}
#SRB-58-10-golub_{VIb}	.A.
#SRB-7625-09-golub_{VIb}	.A.
#PPMV-1/Belgium/11-09620/2011_{(JX901124)}_{VIb}T
#1168_84GB_pigeon_{VIb}	...	C..T	G..
#Denmark/PDKPI95103_{(AY175755)}_{VIb}	...	C..	...	G..TA
#dove/Italy/2736/00_{(AY562989)}_{VIb}	...	CT.TTAATG
#Germany/PDEPI94216_{(AY175753)}_{VIb}	...	CT.TTTG
#HU-1114/90_{(AY2521200)}_{VIb}	...	C..T	G..
#HU-655/89_{(AY150120)}_{VIb}	...	C..CA	..T	G..T
#Ireland/PIEPI96302_{(AY175757)}_{VIb}	...	C..T	G..
#IT-150/95_{(AY150145)}_{VIb}	...	C..	G..CA	..T	G..
#IT-152/96_{(AY150147)}_{VIb}	...	C..T	G..
#IT-227/82_{(AJ880277)}_{VIb}	...	C..T	G..
#JS/07/16/Pi_{(FJ766527)}_{VIb}	...	CT.T
#JS/2/98/Go_{(AF456439)}_{VIb}	...	C..	...	G..TA
#PB9601_{VIb}	...	C..	...	G..TA
#United_Kingdom/PUKPI89124_{(AY175768)}_{VIb}	...	C..T	G..
#United_Kingdom/PUKPI99064_{(AY175770)}_{VIb}	...	CT.
#Israel70_{VIa}	..T	CT.TA	G..
#H310-82_{(AF001112)}_{VIc}	..T	CT.	..TTA	G..
#DK-1/95_{(AF001129)}_{VIId}	..T	CT.	..TTG	G..
#Sh-2/98_{(AF458017)}_{VIId}	..T	CT.	..TT	..C	G..
#ZhJ-2/86_{(AF458016)}_{VIId}	..T	T.	..TT	G..
#Wawrick_{(Z12111)}_{VIe}	..T	CT.TA	G..
#FJ/1/85/Ch_{(FJ436304)}_{IX}	C..T	CT.	..A	..ATC	..T	..ATAAA	..GC	G..	..C
#QH1_{(FJ751918)}_{VIII}	..T	C..	..A	G..	...	T..ATAG	G..	..C
#Chicken/Bulgaria_{-Burgas/06}_{VII}	C..T	C..	..A	..TTA	..A	..A	..A	..A	..A	..A	..GGG	...	G..	...	G..	...
#SRB-7092-06_{VII}	C..T	C..	..ATA	..A	..A	..A	..A	..A	..GGG	...	G..	...	G..	...	G..
#China-G1F3-03_{VII}	C..T	CT.	..ATA	..A	..A	..A	..A	..A	..GGG	...	G..	...	G..	...	G..
#HR-Zelina-94_{V}	..T	CT.	..AA	..TA	..TAGGG	...	G..	...	G..	...	G..
#Italien_{(EU293914)}_{IV}	C..T	CT.	..AT	..TA	..CACGG	...	G..	..C
#Mukteswar_{(EF201805)}_{III}	C..T	CT.	..A	..TT	..TC	..A	..CGGGG	...	G..T	..C
#France/EFRPI99117_{(AY175702)}_{II}	..T	C..	G..A	..A	..C	A..	..TT	..A	..A	..T	..A	..A	..T	..CCCG	..C
#South_Africa/PZAPI99091_{(AY175774)}_{I}	..T	C..	..ACTT	..A	..GGCCCG	..C

#NDV/pigeon/Macedonia/234/2007_{VIb}	203	TAC	ACC	TCA	TCT	CAG	ACA	GGG	TCA	ATC	ATA	GTC	AAG	TTG	CTC	CCG	AAT	ATG	CCC	AAG	GAC	AAA	GAG	GCA	TGT	GCA	AAA
#NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/230/2008_{VIb}	G .G.
#NDV/pigeon/Macedonia/232/2008_{VIb}	G .G.
#NDV/pigeon/Macedonia/962/2008_{VIb}	
#NDV/chicken/Macedonia/231/2010_{VIb}	G .G.
#NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010_{VIb}	G .G.
#NDV/pigeon/Macedonia/233/2011_{VIb}	G .G.
#NDV/pigeon/Macedonia/415/2011_{VIb}	G .G.
#NDV/pigeon/Macedonia/419/2011_{VIb}	G .G.
#NDV/feral_pigeon/Macedonia/9701/2012_{VIb}	G .G.
#SRB-58-10-golub_{VIb}	G .G.
#SRB-7625-09-golub_{VIb}	G .G.
#PPMV-1/Belgium/11-09620/2011_(JX901124)_{VIb}	G .G.
#1168_84GB_pigeon_{VIb}	AG
#Denmark/PDKPI95103_(AY175755)_{VIb}	GT
#dove/Italy/2736/00_(AY562989)_{VIb}	C
#Germany/PDEPI94216_(AY175753)_{VIb}	
#HU-1114/90_(AY2521200)_{VIb}	CG
#HU-655/89_(AY150120)_{VIb}	CG
#Ireland/PIEPI96302_(AY175757)_{VIb}	CG
#IT-150/95_(AY150145)_{VIb}	CCTG
#IT-152/96_(AY150147)_{VIb}	CTG
#IT-227/82_(AJ880277)_{VIb}	CG
#JS/07/16/Pi_(FJ766527)_{VIb}	GG .G.
#JS/2/98/Go_(AF456439)_{VIb}	
#PB9601_{VIb}	
#United_Kingdom/PUKPI89124_(AY175768)_{VIb}	C
#United_Kingdom/PUKPI99064_(AY175770)_{VIb}	G .G.
#Israel70_{VIa}	AATG
#H310-82_(AF001112)_{VIc}	TACTG
#DK-1/95_(AF001129)_{VIc}	GAA	..CT	..G	..G
#Sh-2/98_(AF458017)_{VIc}	GAATG
#ZhJ-2/86_(AF458016)_{VIc}	GAATG
#Wawrick_{Z12111}_{VIe}	GA	..T	..ATG	..C	..C
#FJ/1/85/Ch_(FJ436304)_{IX}	AAATTG
#QH1_(FJ751918)_{VIII}	GAATGG .G.
#Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06_{VII}	G	..TAAGA	..T	..G	..G	..G	..G	..G	..G	..G .G.
#SRB-7092-06_{VII}	GAAGA	..T	..G	..G	..G	..G	..G	..G	..G .G.
#China-G1F3-03_{VII}	GAAT	..G	..G	..G	..G	..G	..G	..G	..G .G.
#HR-Zelina-94_{V}	TA	..TGCCTG	..C
#Italien_(EU293914)_{IV}	CA	..AAG
#Mukteswar_(EF201805)_{III}	CA	..AA
#France/EFRPI99117_(AY175702)_{II}	CAT	..C	..CCTGG .G.
#South_Africa/PZAPI99091_(AY175774)_{I}	A	..AA	..TA	..T	..G

#NDV/pigeon/Macedonia/234/2007_{VIb}	280	GCC	CCA	TTA	GAG	GCA	TAC	AAC	AGA	ACA	CTG	ACC	ACT	TTA	CTC	ACC	CCC	CTT	GGT	GAT	TCC	ATC	CGC	AGG	ATA	CAA	GGA
#NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/230/2008_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/232/2008_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/962/2008_{VIb}	
#NDV/chicken/Macedonia/231/2010_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/233/2011_{VIb}	G
#NDV/pigeon/Macedonia/415/2011_{VIb}	
#NDV/pigeon/Macedonia/419/2011_{VIb}	C
#NDV/feral_pigeon/Macedonia/9701/2012_{VIb}	
#SRB-58-10-golub_{VIb}	
#SRB-7625-09-golub_{VIb}	
#PPMV-1/Belgium/11-09620/2011_{(JX901124)}_{VIb}	C
#1168_84GB_pigeon_{VIb}	GAG
#Denmark/PDKPI95103_{(AY175755)}_{VIb}	CAG
#dove/Italy/2736/00_{(AY562989)}_{VIb}	GG
#Germany/PDEPI94216_{(AY175753)}_{VIb}	GG
#HU-1114/90_{(AY2521200)}_{VIb}	GATG
#HU-655/89_{(AY150120)}_{VIb}	GAG
#Ireland/PIEPI96302_{(AY175757)}_{VIb}	GAG
#IT-150/95_{(AY150145)}_{VIb}	GAGC	..AG
#IT-152/96_{(AY150147)}_{VIb}	GATG
#IT-227/82_{(AJ880277)}_{VIb}	GAG
#JS/07/16/Pi_{(FJ766527)}_{VIb}	GG
#JS/2/98/Go_{(AF456439)}_{VIb}	T	..C	..AAG
#PB9601_{VIb}	T	..C	..AAG
#United_Kingdom/PUKPI89124_{(AY175768)}_{VIb}	GATG
#United_Kingdom/PUKPI99064_{(AY175770)}_{VIb}	GG
#Israel70_{VIa}	GAG
#H310-82_{(AF001112)}_{VIc}		..TAT	..T	..TCG
#DK-1/95_{(AF001129)}_{VIId}	CAT	..AG
#Sh-2/98_{(AF458017)}_{VIId}	GAT	..ATG
#ZhJ-2/86_{(AF458016)}_{VIId}	GAT	..AG
#Wawrick_{(Z12111)}_{VIe}	GG	..CAGTG
#FJ/1/85/Ch_{(FJ436304)}_{IX}	G	..GGT	..GTAG
#QH1_{(FJ751918)}_{VIII}		A..T	..G	..GTG
#Chicken/Bulgaria_{-Burgas/06}_{VII}	TT	..GT	..TC	..CA	..CG
#SRB-7092-06_{VII}	T	..AT	..GT	..TC	..CT	..A	..CG
#China-G1F3-03_{VII}		..TTT	..C	..GT	..TC	..CA	..CG
#HR-Zelina-94_{V}		..TGTTC	..CAAG
#Italien_{(EU293914)}_{IV}	GT	..GT	..GC	A	..TAG
#Mukteswar_{(EF201805)}_{III}	GTGT	..G	..TTAG
#France/EFRPI99117_{(AY175702)}_{II}	C	..G	..TG	..TG	..TC	..TTTAG
#South_Africa/PZAPI99091_{(AY175774)}_{I}	G	..GGT	..T	..GT	..T	..TAG

#NDV/pigeon/Macedonia/234/2007_{VIb}	359	TCT	GTG	TCC	ACA	TCA	GGA	GGA	AGG	AGG	CAG	AAG	CGC	TTC	ATA	GGT	GCC	ATT	ATA	GGC	AGT	GT	420
#NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007_{VIb}		G.G	
#NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007_{VIb}		
#NDV/pigeon/Macedonia/230/2008_{VIb}		
#NDV/pigeon/Macedonia/232/2008_{VIb}		
#NDV/pigeon/Macedonia/962/2008_{VIb}		G.G	
#NDV/chicken/Macedonia/231/2010_{VIb}		
#NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010_{VIb}		
#NDV/pigeon/Macedonia/233/2011_{VIb}		
#NDV/pigeon/Macedonia/415/2011_{VIb}		
#NDV/pigeon/Macedonia/419/2011_{VIb}		G..	
#NDV/feral_pigeon/Macedonia/9701/2012_{VIb}		
#SRB-58-10-golub_{VIb}		
#SRB-7625-09-golub_{VIb}		
#PPMV-1/Belgium/11-09620/2011_(JX901124)_{VIb}		
#1168_84GB_pigeon_{VIb}		G..	A	
#Denmark/PDKPI95103_(AY175755)_{VIb}		A.G	A.	A	
#dove/Italy/2736/00_(AY562989)_{VIb}		T.	A..	A	
#Germany/PDEPI94216_(AY175753)_{VIb}		T.	A..	
#HU-1114/90_(AY2521200)_{VIb}		G.A	A	
#HU-655/89_(AY150120)_{VIb}		G.A	A	
#Ireland/PIEPI96302_(AY175757)_{VIb}		G.	A	
#IT-150/95_(AY150145)_{VIb}		G.A	A	
#IT-152/96_(AY150147)_{VIb}		C.	G.A	A	
#IT-227/82_(AJ880277)_{VIb}		G..	A	
#JS/07/16/Pi_(FJ766527)_{VIb}		GA	
#JS/2/98/Go_(AF456439)_{VIb}		G	A.	A.	A	...	G	
#PB9601_{VIb}		G	A.	A.	A	...	G	
#United_Kingdom/PUKPI89124_(AY175768)_{VIb}		G	G.	A	
#United_Kingdom/PUKPI99064_(AY175770)_{VIb}		
#Israel70_{VIa}		T	A	A	
#H310-82_(AF001112)_{VIc}		T	...	T	A	A	
#DK-1/95_(AF001129)_{VIc}		T	A	A	
#Sh-2/98_(AF458017)_{VIc}		T	A	A	
#ZhJ-2/86_(AF458016)_{VIc}		T	A	A	
#Wawrick_(Z12111)_{VIe}		...	A.	A	A	G.	
#FJ/1/85/Ch_(FJ436304)_{IX}		...	C.	A.T	G	C	GA	
#QH1_(FJ751918)_{VIII}		A.T	...	T	T	G	G.	
#Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06_{VII}		G	T	A	A	T	G.	
#SRB-7092-06_{VII}		G	T	A	A	A	T	G.	
#China-G1F3-03_{VII}		G	T	A	A	A	G.	
#HR-Zelina-94_{V}		...	C.	A.T	...	T	A	A	T	G.	
#Italien_(EU293914)_{IV}		A.T	...	T	C	...	A	GA	
#Mukteswar_(EF201805)_{III}		A.T	...	C	A	GA	
#France/EFRPI99117_(AY175702)_{II}		A.T	...	T	...	G	G.	A	...	GG.	...	C.T	G.	
#South_Africa/PZAPI99091_(AY175774)_{I}		A.T	...	T	G.	AA	...	GGA	...	C.T	G.	C

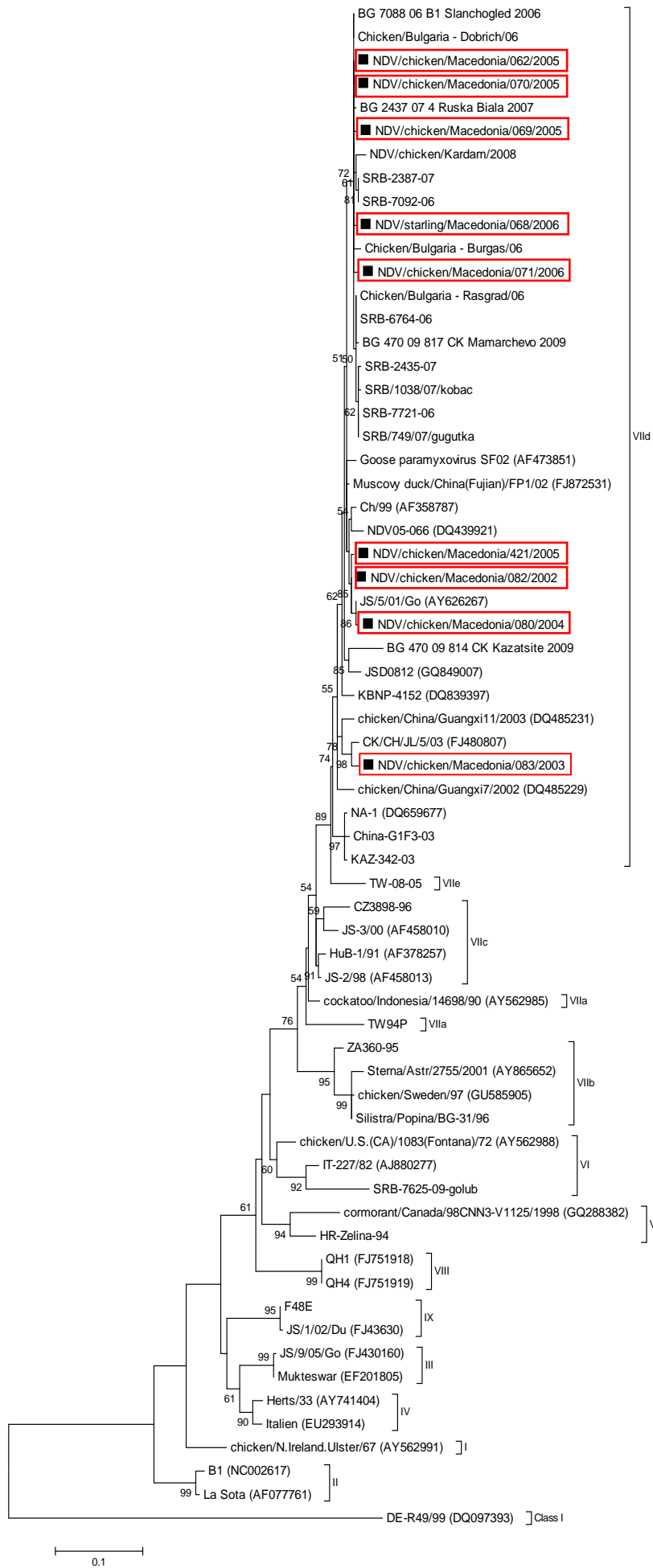
Табела 5.15. Порамнување на аминокиселинските резидуи на делот на Φ генот од позиција nt 47 – 420 меѓу гулабовите соеви откриени во Македонија (врамени со црвена боја), со соеви од регионот и референтни соеви од секоја геногрупа.

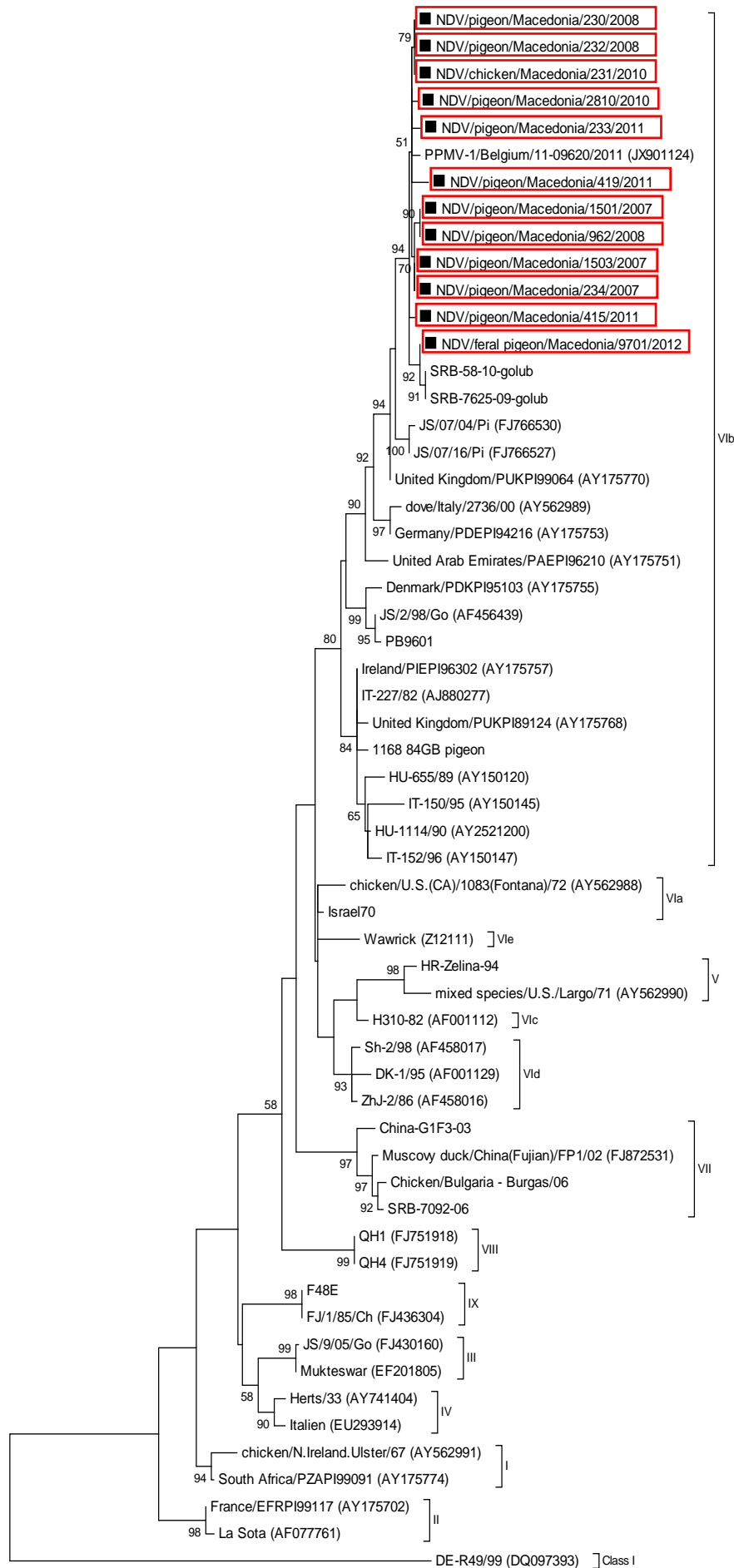
#NDV/pigeon/Macedonia/234/2007_{Vib}	MGSKPHTRIP	APLTLITRIT	LVLSCICSTS	SLDGRPLAAA	GIVVTGDKAI	NIYTSSQTGS	IIVKLLPNMP	KDKEACAKAP
#NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007_{Vib}
#NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007_{Vib}
#NDV/pigeon/Macedonia/230/2008_{Vib}R..
#NDV/pigeon/Macedonia/232/2008_{Vib}R..
#NDV/pigeon/Macedonia/962/2008_{Vib}
#NDV/chicken/Macedonia/231/2010_{Vib}R..
#NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010_{Vib}I..R..
#NDV/pigeon/Macedonia/233/2011_{Vib}S....
#NDV/pigeon/Macedonia/415/2011_{Vib}M....Y..
#NDV/pigeon/Macedonia/419/2011_{Vib}T....
#NDV/feral_pigeon/Macedonia/9701/2012_{Vib}S.M....
#SRB-58-10-golub_{Vib}S....S.M....Y..
#SRB-7625-09-golub_{Vib}S....S.M....Y..
#PPMV-1/Belgium/11-09620/2011_(JX901124)_{Vib}I..
#1168_84GB_pigeon_{Vib}S....	V.....TM	I.....P..V
#Denmark/PDKPI95103_(AY175755)_{Vib}SA..	V.PM....M	I.....P.G
#dove/Italy/2736/00_(AY562989)_{Vib}S....M....	I.....L..V.
#Germany/PDEPI94216_(AY175753)_{Vib}S....M....	I.....L..V.
#HU-1114/90_(AY2521200)_{Vib}S.M..	V.....TM	I.C...P..V
#HU-655/89_(AY150120)_{Vib}SS.M.	V.....TM	L.....P..
#Ireland/PIEPI96302_(AY175757)_{Vib}S....	V.....TM	I.....P..V
#IT-150/95_(AY150145)_{Vib}P.M..	V.....TM	I.C...PA.V
#IT-152/96_(AY150147)_{Vib}S.M..	V.....M	I.C...P..V
#IT-227/82_(AJ880277)_{Vib}S....	V.....TM	I.....P..V
#JS/07/16/Pi_(FJ766527)_{Vib}M....L..
#JS/2/98/Go_(AF456439)_{Vib}S....	V.PM....M	I.....P.G
#PB9601_{Vib}R.S...	V.PM....M	I.....P.G
#United_Kingdom/PUKPI89124_(AY175768)_{Vib}S....L	V.....TM	I.....P..V
#United_Kingdom/PUKPI99064_(AY175770)_{Vib}Y....M....L..
#Israel70_{VIa}S....	V.M....M	I.....L..VI..
#H310-82_(AF001112)_{VIC}S..VS	V.M....	I.....L..VI..
#DK-1/95_(AF001129)_{VID}S..VS	V.PM....	I.....L..VI..
#Sh-2/98_(AF458017)_{VID}S...S	V.PM....	I.....L..VI..
#ZhJ-2/86_(AF458016)_{VID}S...S	V.PM...Q..	I.....L..VI..
#Wawrick_(Z12111)_{VIE}S....	V.M....M	I.....L..VR..
#FJ/1/85/Ch_(FJ436304)_{IX}	..P.SS.NV.	..M.TV..A	.A...VRL.NV
#QH1_(FJ751918)_{VIII}SS..FL	T.SM....M	I.....P.GVRT.
#Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06_{VII}S....M....M	PI.G..RP.IV.VR..
#SRB-7092-06_{VII}S....M....M	PI.G..RP..V.VR..
#China-G1F3-03_{VII}RSS...M....M	I.....RL..V.VR..
#HR-Zelina-94_{V}S...S	V.M....	I.....L..VL
#Italien_(EU293914)_{IV}RSS...	V.M..I..A	T.....RL..V
#Mukteswar_(EF201805)_{III}	..PRSS...	V.M.TI...	.A..YVRL..V
#France/EFPI99117_(AY175702)_{II}	..R.S.KN.	..MM.TI.VAPAN	I.....VL
#South_Africa/PZAPI99091_(AY175774)_{I}	..RSS...	V.M.TV.VA	.A...V.P..V

#NDV/pigeon/Macedonia/234/2007_{VIb}	LEAYNRTLTT	LLTPLGDSIR	RIQGSVSTSG	<u>GRRQKRF</u> IGA	IIGS
#NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007_{VIb}A..
#NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/230/2008_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/232/2008_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/962/2008_{VIb}A..
#NDV/chicken/Macedonia/231/2010_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/233/2011_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/415/2011_{VIb}
#NDV/pigeon/Macedonia/419/2011_{VIb}G
#NDV/feral_pigeon/Macedonia/9701/2012_{VIb}
#SRB-58-10-golub_{VIb}
#SRB-7625-09-golub_{VIb}
#PPMV-1/Belgium/11-09620/2011_{(JX901124)}_{VIb}
#1168_84GB_pigeon_{VIb}G.....
#Denmark/PDKPI95103_{(AY175755)}_{VIb}R	E.....
#dove/Italy/2736/00_{(AY562989)}_{VIb}	V..K.....
#Germany/PDEPI94216_{(AY175753)}_{VIb}	V..K.....
#HU-1114/90_{(AY2521200)}_{VIb}G.....
#HU-655/89_{(AY150120)}_{VIb}G.....
#Ireland/PIEPI96302_{(AY175757)}_{VIb}G.....
#IT-150/95_{(AY150145)}_{VIb}AG.....
#IT-152/96_{(AY150147)}_{VIb}P.	..G.....
#IT-227/82_{(AJ880277)}_{VIb}G.....
#JS/07/16/Pi_{(FJ766527)}_{VIb}R.....
#JS/2/98/Go_{(AF456439)}_{VIb}	EK.....
#PB9601_{VIb}	EK.....
#United_Kingdom/PUKPI89124_{(AY175768)}_{VIb}G.....
#United_Kingdom/PUKPI99064_{(AY175770)}_{VIb}
#Israel70_{VIa}
#H310-82_{(AF001112)}_{VIc}S
#DK-1/95_{(AF001129)}_{VIId}S
#Sh-2/98_{(AF458017)}_{VIId}S
#ZhJ-2/86_{(AF458016)}_{VIId}S
#Wawrick_{(Z12111)}_{VIE}P.T...	V...
#FJ/1/85/Ch_{(FJ436304)}_{IX}E.AT...R.....
#QH1_{(FJ751918)}_{VIII}T...	V...
#Chicken/Bulgaria_-_Burgas/06_{VII}K.....	V...
#SRB-7092-06_{VII}K.....K.....	V...
#China-G1F3-03_{VII}K.....	V...
#HR-Zelina-94_{V}E.AT...V.....
#Italien_{(EU293914)}_{IV}N...E..T...R.....
#Mukteswar_{(EF201805)}_{III}E..T...R.....
#France/EFRPI99117_{(AY175702)}_{II}	..D.....E..T...	..G..G.L...	...G
#South_Africa/PZAPI99091_{(AY175774)}_{I}E..T...	..GK.G.L...	...G

5.10. Резултати од филогенетската анализа на вирусите на Њукастелската болест, откриени во Република Македонија

Секвенцијата на делот на Ф генот од позиција 47 до 420 во должина од 374 нуклеотиди, којашто го опфаќа и МР, се искористи за порамнување на секвенциите и изработка на филогенетски стебла со цел да се спореди сродноста и мутациите на вирусите откриени во Република Македонија со вирусите од регионот и со други референтни соеви на глобално ниво.





0.1

↑Слика 5.21. Филогенетско стебло на ВЊБ соеви, направено врз основа на делумни нуклеотидни секвенции на *Φ* ген (nt 47 – 420). Класификацијата по генотипови е означена на десната страна. Стеблото е направено со 'maximum-likelihood' метод во MEGA 5.1. со „bootstrap“ 1000 за да се додели веродостојност на групирањето.

↑Слика 5.22. Филогенетско стебло на ВЊБ соеви, направено врз основа на делумни нуклеотидни секвенции на *Φ* ген (nt 47 – 420). Класификацијата по генотипови е означена на десната страна. Стеблото е направено со 'maximum-likelihood' метод во MEGA 5.1. со „bootstrap“ 1000 за да се додели веродостојност на групирањето.



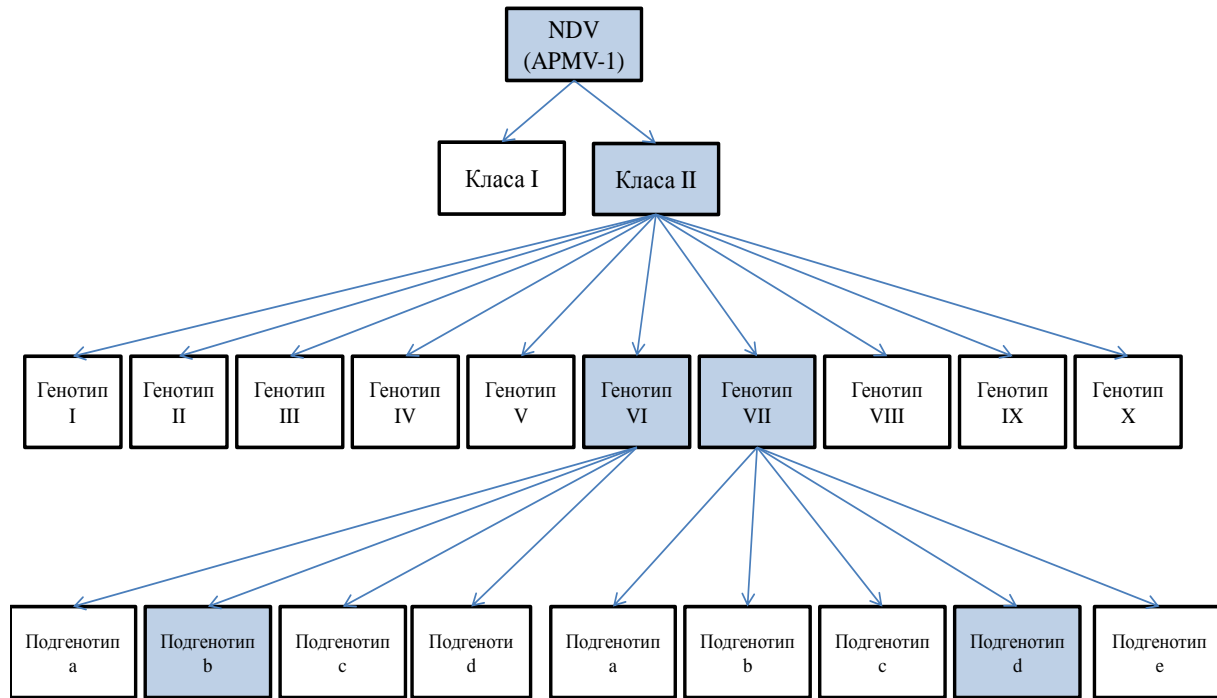
*гулабов сој, изолиран од кокошка

**класичен сој, изолиран од сколовранец

Слика 5.23. Географско-временска дистрибуција на поединечните ВЊБ откриени во Македонија

Табела 5.16. Вируленција и филогенетска припадност на откриените ВЊБ во Македонија

Реден број	Ознака на вирус	Пристапен број GenBank	Аминокиселински мотив на местото на сечење на Φ генот ($\Phi 0$ прекурсор)	ИЦПИ	Вируленција	Генотип
1	NDV/chicken/Macedonia/082/2002	KC915217	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIIId
2	NDV/chicken/Macedonia/083/2003	KC915218	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIIId
3	NDV/chicken/Macedonia/080/2004	KC915219	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	1,91	Вирулентен	VIIId
4	NDV/chicken/Macedonia/062/2005	KC915220	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIIId
5	NDV/chicken/Macedonia/069/2005	KC915221	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	1,90	Вирулентен	VIIId
6	NDV/chicken/Macedonia/070/2005	KC915222	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	1,88	Вирулентен	VIIId
7	NDV/chicken/Macedonia/421/2005	KC915223	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIIId
8	NDV/starling/Macedonia/068/2006	KC915224	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIIId
9	NDV/chicken/Macedonia/071/2006	KC915225	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIIId
10	NDV/pigeon/Macedonia/234/2007	KC915205	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	0,96	Вирулентен	VIb
11	NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007	KC915206	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	1,53	Вирулентен	VIb
12	NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007	KC915207	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIb
13	NDV/pigeon/Macedonia/230/2008	KC915208	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	0,84	Вирулентен	VIb
14	NDV/pigeon/Macedonia/232/2008	KC915209	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	0,59	Вирулентен	VIb
15	NDV/pigeon/Macedonia/962/2008	KC915210	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIb
16	NDV/chicken/Macedonia/231/2010	KC915211	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	0,81	Вирулентен	VIb
17	NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010	KC915212	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIb
18	NDV/pigeon/Macedonia/233/2011	KC915213	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	1,19	Вирулентен	VIb
19	NDV/pigeon/Macedonia/415/2011	KC915214	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIb
20	NDV/pigeon/Macedonia/419/2011	KC915215	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIb
21	NDV/feralpigeon/Macedonia/9701/2012	KC915216	¹¹² RRQKR*FIG ¹¹⁹	-	Вирулентен	VIb



Слика 5.24. Шематски приказ на генотиповите на ВЊБ; со бледосина боја се означени генотиповите / лозите коишто се откриени во Македонија во оваа дисертација

6. ДИСКУСИЈА

Од првото појавување на Њукастелската болест во Република Македонија, во 1945 година^[196, 199] до денес, се бележи нејзино појавување речиси секоја година претежно кај селската живина, одгледувана екстензивно, иако вакцинацијата со различни видови вакцини како една од мерките за контрола на ова заболување се применува уште од 1949 година^[133, 199, 200, 201, 202].

Во назначениот период, повремено се појавуваат жаришта кај комерцијалната живина, кокошки и мисирки, но обично се локализирани и се со помал интензитет^[117, 197]. Во ниту еден случај до сега не е извршено целосно докажување и карактеризација на вирусот, поради што не се познати таксономската припадност, патотипот, вируленцијата, сродноста со други вируси и потеклото на ВЊБ што се откриени во Македонија. Во нашето истражување со помош на класични и молекуларни методи, докажани и карактеризирани се 21 сој на ВЊБ откриени во Република Македонија, во периодот од 2002 до 2012 година. Од нив, девет соеви припаѓаат на класичните соеви, додека останатите 12 соеви припаѓаат на ГПМВ-1. Поради антигенската разлика, разликата во вируленција^[20] и молекуларната и филогенетската посебност на гулабовите од класичните соеви^[176], во натамошната дискусија овие две групи ќе се третираат посебно.

Клиничките знаци кај класичните соеви испитувани во овој труд, онаму каде што се познати, одговараат на генерализирана системска инфекција со изразени дигестивни проблеми, проследени со висока смртност. Овие знаци одговараат на сликата што ја предизвикуваат висцеротропните велогени соеви^[30].

Соевите *NDV/chicken/Macedonia/082/2002* и *NDV/chicken/Macedonia/421/2005* коишто се изолирани од фармска живина, предизвикуваат ниска смртност со изразен пад на несивоста. При инфекција со ВЊБ кај несилки, најизразен знак е забележан пад на несивоста или целосно престанување на несењето ^[171]. Ниската смртност, предизвикана од овие два соја, веројатно е резултат на нивото на титарот на антитела против ЊБ, којшто го имале кокошките пред влезот на инфекцијата. Интензитетот на клиничките знаци кај вакцинирани јата зависи од титарот на антитела, т.е. колку е повисок титарот толку ќе се намалува интензитетот на клиничките знаци ^[23], што може да значи дека кокошките немале доволно висок титар на антитела против ЊБ за целосна заштита. Но, без разлика на висината на титарот кај вакцинирани кокошки, може да се случи пробив на имунитетот проследен со висока смртност, доколку вакцинираниот сој е хетерологен, односно не овозможува вкрстена заштита против теренскиот сој ^[191]. Видливи патоанатомски знаци што се предизвикани од испитуваните класични соеви се крвавење и некроза на цекалните тонзили и другото лимфно ткиво во цревата, мултифокални крвавења и улцерации во преджелудникот, крвавења во трахејата, фокална некроза на слезината, воспаление на клоаката, кај несилките „egg“ перитонитис, а во неколку случаи и крвавења на поткожното ткиво на главата. Во литературата се опишани: присуство на мултифокални крвавења на серозната површина на цревата, мултифокална некроза и/или улцерација на лимфното ткиво во цревата (најпрепознатливо на цекалните тонзили), распространета фокална некроза на слезината, мултифокални крвавења и улцерации во преджелудникот ^[42], додека респираторните промени се ретко присутни, а доколку ги има најчесто се во облик на трахеални крвавења ^[14], особено во кранијалниот дел на трахејата и се последица на некроза на ларингеалните тонзили ^[180].

Во достапната литература, којашто ја имаме на увид, не се опишани крвавења на поткожното ткиво на главата кај ЊБ, туку само кај високопатогената авијарна инфлуенца *H5N1* ^[171].

Кај испитуваните ГПМВ-1, претежно се забележуваат нервни знаци, што најчесто се манифестираат во облик на некоординирано движење, поткривнување, нестабилно летање, тортиколис и опистотонус. Постојат извесни варијации во стапката на смртност кај гулабите, така што таа кај младите единки е повисока, додека кај возрасните единки е пониска.

Според *Terregino* и *Carua*^[171], младите гулаби се прилично подложни на инфекција и кај нив смртноста и морбидитетот можат да достигнат и до 100%, проследено со претежно нервни знаци. Од друга страна, кај возрасните гулаби морбидитетот е вообичаено под 10%, а смртта настанува во хроничен тек.

Соевите *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007* и *NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007* предизвикуваат повисока смртност од другите соеви, можеби поради тоа што се изолирани од исто одгледувалиште, што значи дека во исто време има коциркулација на два вируса или пак, едноставно станува збор за вирулентни соеви, особено ако се има предвид вредноста на ИЦПИ кај сојот *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007* од 1,53, којашто го класифицира во велогени соеви. Патоанатомските промени се најчесто лоцирани во дигестивниот систем и се одликуваат со хеморагични промени во цревата, поретко се забележуваат промени во респираторниот систем, додека отсутни се видливи промени во нервниот систем. Кај гулаби природно инфицирани со ГПМВ-1, макроскопските видливи промени се состојат од некроза на панкреасот, воспаление на цревата и крвавења во преджелудникот^[137]. Без разлика на патотипот и видот, не се забележуваат видливи промени на централниот нервен систем кај птици инфицирани со ВЊБ^[171].

Од деветте класични соеви, кај пет соеви (*NDV/chicken/Macedonia/082/2002*, *NDV/chicken/Macedonia/083/2003*, *NDV/chicken/Macedonia/062/2005*, *NDV/starling/Macedonia/068/2006*, *NDV/chicken/Macedonia/071/2006*) не успеавме да извршиме изолација на вирусот од ЕКЈ, иако се позитивни на *RT-qPCR* за детекција на М ген и на Ф ген со протоколот според *Wise et al.*^[185], веројатно поради присуството на делови од РНК на вирусот, но не и жив вирус или поради мошне ниската концентрација на вирусот во материјалот за лабораториското испитување.

Brown^[37] известува за неможноста да се изолира вирус, веројатно поради неговата ниска концентрација, иако резултатите од *RT-qPCR* од орофарингеални и клоакални брисеви се позитивни. Кај другите соеви, вирусот е изолиран веќе по првата пасажа, што е карактеристично за класичните соеви^[102]. Сите соеви, освен сојот *NDV/chicken/Macedonia/083/2003* се позитивни на „semi-nested RT-PCR“, којшто е модификација на протоколот според *Aldous et al.*^[5], со очекувана големина на производот од 500 БП, т.е. по реамплификација на амплификатот од првиот *RT-PCR*. Соевите кај коишто е изолиран вирус, дополнително се тестирани со класични методи за да се изврши

докажување и типизација на вирусот (тест на ХА и тест на ИХА) и за да се одреди неговиот патотип (тест на ИЦПИ). Во тестот на ИХА, поликлонскиот антисерум за ВЊБ и мАт *U85*, специфични за класичните соеви ја инхибираат ХА активност на сите соеви, додека со другите мАт нема инхибиција на ХА. Вредностите на ИЦПИ под 0,7 се карактеристични за лентогените соеви, што значи дека сè што е над тоа мора задолжително да се пријави до *OIE* ^[188]. Вирусите коишто поседуваат ИЦПИ од 0,7 до 1,5, спаѓаат во групата на мезогени соеви, а оние со ИЦПИ над 1,5 спаѓаат во групата на велогени соеви ^[10]. Врз основа на вредностите на ИЦПИ на испитуваните соеви, коишто се блиску до максималната вредност, соевите *NDV/chicken/Macedonia/080/2004*, *NDV/chicken/Macedonia/069/2005* и *NDV/chicken/Macedonia/070/2005* спаѓаат во групата на велогени, т.е. високовирулентни соеви.

Кај сите 12 ГПМВ-1 извршивме изолација на вирусот на ЕКЈ по втора пасажа, додека кај сојот *NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007* го изолиравме вирусот по трета пасажа. Изолација на ВЊБ по трета пасажа е доста ретка и се случува во околу 5% од случаите, но сепак треба да се има предвид дека некои соеви на ГПМВ-1 подобро се изолираат на клеточни култури отколку што се изолираат на ЕКЈ ^[102]. Во тестот на ИХА поликлонскиот антисерум за ВЊБ и мАт 617/161, специфични за ГПМВ-1, ја инхибираат ХА активност на сите соеви, вклучително и на сојот *NDV/chicken/Macedonia/231/2010*, додека со другите мАт нема појава на инхибиција на ХА. Појавата на ГПМВ-1 кај живината е вообичаена појава и претежно се случува кај мали јата на селска или украсна живина, каде што биосигурноста е минимална и е можен контакт со диви птици.

Во земјите на ЕУ, од 2000 до 2009 година се регистрирани 14 жаришта на ЊБ кај живината, каде што причинители биле ГПМВ-1 ^[13]. Вредностите на ИЦПИ на ГПМВ-1 се поразлични за разлика од оние кај класичните соеви и се движат од 0,59 до 1,53. Соевите *NDV/pigeon/Macedonia/232/2008* и *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007* отскокнуваат од карактеристичниот шаблон на ИЦПИ кај ГПМВ-1. Сојот *NDV/pigeon/Macedonia/232/2008* поседува ИЦПИ 0,59, што значи дека врз основа на овој *in vivo* тест за одредување на патогеноста, овој вирус спаѓа во лентогени соеви. Од друга страна, овој сој поседува аминокиселински мотив на МР на Ф генот ¹¹²*RRQKR*FIG*¹¹⁹, којшто е карактеристичен за високовирулентни соеви ^[49]. Појавата на истовремено поседување вирулентен аминокиселински мотив на МР на Ф генот со ниски ИЦПИ вредности, не е необична за

ГПМВ-1 и е опишана од страна на *Collins et al.* ^[50] и *Meulemans et al.* ^[123]. Овој феномен не е поврзан со Φ протеинот ^[58] туку со репликацискиот комплекс којшто се состои од нуклеопротеинот, фосфопротеинот и полимеразата ^[60]. Дополнително, *Meulemans et al.* ^[123] известуваат дека ГПМВ-1 со аминокиселински мотив на МР на Φ генот ¹¹²*RRQKR*FIG*¹¹⁹, којшто е идентичен со оној на сојот *NDV/pigeon/Macedonia/232/2008*, поседуваат високоваријабилни, но ниски вредности на ИЦПИ (просечно 0,69), додека ГПМВ-1 со мотив ¹¹²*GRQKR*FIG*¹¹⁹, поседуваат високи вредности на ИЦПИ (просечно 1,44). Бидејќи сите испитувани вируси во нивната студија се изолирани од пцовисани спортски гулаби што манифестирале нервни знаци пред пцовисувањето, претпоставуваат дека сите тие се патогени за гулабите. Сојот *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007* поседува ИЦПИ 1,53, што значи дека врз основа на овој *in vivo* тест за одредување на патогеноста овој вирус спаѓа во групата на велогени соеви. Токму во одгледувалиштето, каде како причинител се јавува овој сој, пријавена е невообичаено зголемена смртност. Опишана е појава на зголемени вредности на ИЦПИ и ИВПИ кај ГПМВ-1 пасирани на пилиња или ЕКЈ, што укажува на фактот дека изолатите адаптирани на други птици, освен живината, можат да не ја покажуваат својата потенцијална вируленција кај пилињата при конвенционалните тестови за одредување на патогеноста ^[20]. Поради ова, резултатите за патогеноста на вирусите, добиени по пат на *in vivo* тестови, секогаш треба да бидат потврдени со секвенционирање ^[58].

За идентификација на присуството на вирусна РНК на ВЊБ во алантоисните течности и клиничките примероци, ја користевме *RT-qPCR* методата за детекција на М ген според *Wise et al.* ^[185]. Оваа метода е потврдена од страна на *USDA* и има способност да ги детектира ВЊБ од класата II, без оглед на нивната патогеност ^[185]. Сепак, опишани се и лажно негативни резултати кај одредени вирулентни вируси од класата II, коишто иако позитивни на вирус изолација на јајца, биле негативни на *RT-qPCR* ^[41].

Во нашите испитувања, сите изолати што се позитивни на вирус изолација се позитивни и на *RT-qPCR* за детекција на М ген, уште повеќе со оваа метода се успеало да се детектираат примероци што се негативни на вирус изолација. Кај сите соеви (класични и ГПМВ-1), докажано е присуство на ВЊБ преку детекција на М генот. Класичните соеви коишто се откриени во клинички примероци имаат повисоки ЦК вредности (~25,8) од класичните (~15,5) и ГПМВ-1 (~22,8) соевите, коишто се изолирани од алантоисна

течност, што претставува уште еден индикатор дека во тие примероци има ниска концентрација на вирусна РНК. Гулабовите соеви пак, изолирани од алантоисна течност имаат повисоки ЦК вредности од класичните соеви, изолирани од алантоисна течност. Причина за ова е веројатно некомплементарност на 'прајмерите' и хидролизирачката проба на местото на врзување на геномската секвенција. Во овој тест, како позитивни контроли се користени слаба позитивна контрола (вирулентен сој) и силна позитивна контрола (авирулентен сој), при што обете се позитивни и со очекувани ЦК вредности. Осетливоста на ова испитување покажа дека со оваа метода може да се детектира вирусна РНК екстрахирана од $10^{1.3} EID_{50}/0,2ml$, што е во корелација со резултатите на испитување на осетливоста на *Wise et al.* ^[185], којашто изнесува $10^1 EID_{50}$.

Откако со *RT-qPCR* за детекција на М ген, се докажа дека во сите испитувани примероци има ВЊБ, се пристапи кон одредување на нивната вируленција со *RT-qPCR* за детекција на Ф ген со протоколот според *Wise et al.* ^[185]. Оваа метода е потврдена од страна на *USDA* и има способност да ги детектира вирулентните ВЊБ од класата II ^[185]. Сепак, со оваа метода не е можно да се детектираат вирулентни вируси изолирани од гугутка и гулаби ^[95, 172], поради некомплементарност помеѓу хидролизирачката проба и Ф генот во четири нуклеотиди на местото на нивното врзување ^[96].

Во нашите испитувања, сите изолати коишто се позитивни на вирус изолација се позитивни и на *RT-qPCR* за детекција на Ф ген, уште повеќе со оваа метода се успеало да се детектираат примероци коишто се негативни на вирус изолација. Кај сите соеви има позитивен сигнал на флуоросценција за детекција на Ф генот, што значи дека сите соеви се вирулентни (класичните соеви изолирани и откриени кај селска живина, комерцијална живина и сколовранци; и ГПМВ-1 соеви изолирани од домашни гулаби, див гулаб и селска живина). Класичните вирулентни соеви што се откриени во клинички примероци имаат повисоки ЦК вредности (~35,5) од класичните (~23,0) и ГПМВ-1 (~27,1) соевите, коишто се изолирани од алантоисна течност, што претставува дополнителен индикатор дека во тие примероци има ниска концентрација на вирусна РНК. Гулабовите вирулентни соеви пак, изолирани од алантоисна течност имаат повисоки ЦК вредности од класичните вирулентни соеви изолирани од алантоисна течност. Причина за ова е веројатно некомплементарност на 'прајмерите' и хидролизирачката проба на местото на врзување на геномската секвенција, *Vidanovic* ^[178]. Тенденцијата на добивање повисоки ЦК вредности

при детекција на Φ ген отколку при детекција на M ген е во согласност со резултатите на авторите на протоколот ^[185]. Во овој тест, како позитивна контрола е користена слаба позитивна контрола (вирулентен сој), а силната позитивна контрола (авирулентен сој) во *RT-qPCR* за детекција на M ген во овој случај е негативна контрола, при што првата е позитивна и со очекувана ЦК вредност, додека втората очекувано е негативна. Осетливоста на оваа испитување покажа дека со оваа метода може да се детектира вирусна РНК екстрахирана од $10^{3,3} EID_{50}/0,2ml$, што е во корелација со резултатите на испитување на осетливоста на *Wise et al.* ^[185], којашто изнесува $10^3 EID_{50}$.

За да се потврдат резултатите од *RT-qPCR* за детекција на M ген и на Φ ген и за да се добие амплификуван *PCR* производ, којшто понатаму ќе се искористи како примерок за секвенционирање, сите испитувани соеви се тестирани со *RT-PCR* според *Aldous et al.* ^[5]. Најголемиот дел од примероците по визуелизација на гелот со УВ-зраци се со очекувана големина на *PCR* производот од 700 БП, којашто се добива со првиот пар 'прајмери' ^[5], додека примероците од коишто се откриени соевите *NDV/chicken/Macedonia/071/2006*, *NDV/starling/Macedonia/068/2006*, *NDV/chicken/Macedonia/062/2005* и *NDV/chicken/Macedonia/082/2002* се негативни. Кај овие примероци се пристапи кон „semi-nested“ *RT-PCR* со втор пар 'прајмери', коишто всушност се и 'прајмери' за секвенционирање ^[5]. Очекуваната големина на *PCR* производот од оваа реакција е 500 БП, со тоа што сите испитувани примероци во овој случај имаат видлив *PCR* производ по визуелизација на гелот со УВ-зраци. Ова е во согласност со високите ЦК вредности добиени кај двата *RT-qPCR*, што е последица на малата концентрација на вирус во овие примероци и неможноста да се изолира вирусот од ЕКЈ.

Секвенционирањето на откриените ВЊБ се прави со 'прајмери' со коишто се добива секвенција со големина од 374 нуклеотиди, којашто започнува на стартниот кодон (ATG) на Φ генот на позицијата 47 и завршува на позицијата 420, веднаш по МР на Φ генот ^[5]. Нуклеотидната секвенција на делот на Φ генот од позиција 47 – 420 се смета за стандарден критериум за генотипизација. Врз основа на аминокиселинскиот состав на МР на Φ генот, може да се одреди вируленцијата на вирусот ^[49]. Мезогените и велогените соеви поседуваат повеќебазен аминокиселински мотив на МР на Φ генот ¹¹²*R/G/KR-Q/K-K/R-R*F¹¹⁷*, и можат да се расечат интрацелуларно од страна на убиквитарните протеази, слични на фурилот, што значи можат да се размножуваат и да предизвикуваат промени

секаде во организмот^[69, 130, 132]. Молекуларната основа за вируленција на ВЊБ е вклучена во дефиницијата на *OIE* за пријавување на жариште на ЊБ^[188] и во директивата на ЕУ^[43]. Во нашите испитувања, сите откриени класични и гулабови соеви на ВЊБ поседуваат аминокиселински мотив на МР на Φ генот ¹¹²*RRQKR*FIG*¹¹⁹ и поради тоа ги класифицираме како вирулентни соеви. Овие резултати се во согласност со резултатите добиени од *RT-qPCR* за детекција на Φ ген. Резултатите од одредувањето на ИЦПИ, онаму каде што е одредуван, не се поклопуваат со овие резултати само кај сојот *NDV/pigeon/Macedonia/232/2008*, а причината е објаснета погоре. При секвенционирање на 74 соеви од генотипот *VIIId*, *Wang et al.*^[182] наоѓаат дека дури 73 од нив поседуваат аминокиселински мотив ¹¹²*RRQKR*F*¹¹⁷, додека само еден сој поседува ¹¹²*RRQRR*F*¹¹⁷.

Денес во оптек се две различни класификации на ВЊБ, направени врз основа на генетска анализа. Првата класификација предложена од *Aldous et al.*^[5] е заснована на генетски лози групирани во серотип 1. Оваа класификација ги дели ВЊБ во шест лози (лоза 1 – 6). Во лозите три и четири се формирани подлози (а – d), а во лозата 5 се формирани подлози (а – е). Втората класификација е систематизирана од страна на *Czegledi et al.*^[53] и е заснована на две класи (I и II). Во класата I спаѓаат претежно авирулентни вируси, а класата II е поделена на генотипови од I до IX, каде што спаѓаат авирулентни и вирулентни вируси. Генотиповите VI и VII се состојат од повеќе подгенотипови. Така, лозите 1 и 2 од првата класификација одговараат на генотиповите I и II од втората класификација, лозата 3 на генотиповите III, V, VI и VIII, лозата 4 на генотипот IV, лозата 5 на генотипот VII и лозата 6 на класата I. Во нашето испитување ја користиме втората класификација, систематизирана од страна на *Czegledi et al.*^[53].

Со помош на филогенетската анализа, класичните соеви: *NDV/chicken/Macedonia/082/2002*, *NDV/chicken/Macedonia/083/2003*, *NDV/chicken/Macedonia/080/2004*, *NDV/chicken/Macedonia/062/2005*, *NDV/chicken/Macedonia/069/2005*, *NDV/chicken/Macedonia/070/2005* и *NDV/chicken/Macedonia/421/2005*, спаѓаат во генотипот VII подгенотип VIId. Вирусите од генотипот VII спаѓаат во групата на нови вируси со големина на геномот од 15.192 нуклеотиди^[53, 56, 87, 175]. Тие се предизвикувачи на последната четврта панзоотија и се појавени на крајот на 1980-тите години на Далечниот Исток^[75, 115, 116].

Најрана изолација на вирус од генотипот VII е направена во Тајван, во 1984 година^[189]. Генотипот VII е првично поделен на два подгенотипа, коишто се појавени во 1990-тите години на Далечниот Исток: VIIa каде што спаѓаат вирусите што се шират во Европа и Азија и VIIb каде што спаѓаат вирусите што се шират во Јужна Африка^[5], а подоцна стигнуваат до Јужна Европа^[75]. Овие два генотипа дополнително се делат на VIIc, VIId и VIIe, и тука спаѓаат изолати од Кина, Казахстан и Јужна Африка^[35, 182]. Во рамките на генотипот VII или лозата 5 според *Aldous et al.*^[5] се појавуваат нови кластери означени како 5f, 5g и 5h каде што спаѓаат африканските изолати^[162]. Од почетокот на 1990-тите години до денес, генотипот VII е најчесто изолиран ВЊБ низ целиот свет, а во регионални рамки овие соеви поседуваат заеднички ендемски карактеристики, што укажува на пренесување на промените и варијабилноста на вирусите^[144]. Вирусите од генотипот VII се сметаат за главни патогени кај живината во Кина во последните години, од коишто соевите од генотипот VIId се најдоминантни патогени и се одговорни за поголемиот број жаришта на ЊБ кај гуските и патките во Кина^[114]. Вирусите од генотипот VIId имаат ензоотски карактер во последните години во Кина^[182].

Во поглед на аминокиселинскиот состав на делот на Ф генот, карактеристично за вирусите од генотипот VIId е супституција на резидуата 101 R→K и на резидуата 121 I→V^[182]. Сите македонски класични соеви го поседуваат овој шаблон, освен сојот *NDV/chicken/Macedonia/080/2004*, којшто на резидуата 121 нема супституција. Таква карактеристика од соевите користени за споредба во овој труд има само сојот *JS/5/01/Go*, којшто е изолиран од гуска во 2001 година во Кина^[115] и врз основа на филогенетската анализа тој е најмногу сличен со него.

Во Европа, соевите од генотипот VIId се појавуваат на почетокот на овој век и според достапната литература прв пријавен случај на VIId е во Грција, во 2004 година^[13]. Во европски рамки, изолацијата на овие вируси претежно доаѓа од земјите на Југоисточна Европа^[13].

Во 2004 година, Бугарија пријавува жаришта на ЊБ до *OIE* во местото Карцали, без назнака за кој генотип станува збор, но ако се има предвид дека следната година (2005) во Бугарија од истото место е изолиран VIId вирус, мошне веројатно е дека и жариштата во 2004 година се предизвикани од овој генотип. Според податоците на ОИЕ^[133], во периодот од 2000 до 2004 година, од земјите во регионот покрај гореспоменатите жаришта во

Грција и Бугарија, жаришта на ЊБ пријавуваат: Македонија во 2000, 2001, 2002, 2003 и 2004 година без назнака на генотипот; Албанија во 2000, 2002 и 2003 година без назнака на генотипот; Србија во 2001 и 2002 година без назнака на генотипот. *Vidanovic*^[178], кај српските изолати од живина, гулаби и диви птици изолирани во 2005 и 2006 година, сите припадници на генотипот VIIId, наоѓа филогенетска сличност со украински и романски изолати од 2005, 2008 и 2009 година и грчки изолати од 2004, 2005 и 2007 година, сите припадници на генотипот VIIId. Претходно, *Wehmann et al.*^[183] известуваат за ендемско присуство на вирусите само од генотипот V во Србија, Босна и Херцеговина, Хрватска и Словенија, во периодот од 1979 до 2002 година.

Врз основа на податоците со коишто располагаме, може да се каже дека соевите *NDV/chicken/Macedonia/082/2002* и *NDV/chicken/Macedonia/083/2003* се едни од првите откриени и карактеризирани соеви од генотипот VIIId во Југоисточна Европа. Ова значи дека вирусите од генотипот VIIId циркулирале на овие простори порано од 2004 година, но не биле откриени и филогенетски карактеризирани. За жал, за сојот *NDV/chicken/Macedonia/083/2003*, освен годината на мострирање и домаќинот, други податоци не се познати.

Сојот *NDV/chicken/Macedonia/082/2002* од македонските соеви, најголема филогенетска сличност покажува со соевите *NDV/chicken/Macedonia/080/2004* и *NDV/chicken/Macedonia/421/2005*. За сојот *NDV/chicken/Macedonia/080/2004*, освен годината на мострирање и домаќинот, други податоци не се познати, додека другите два соја се откриени кај фармска живина со целосно помината програма за вакцинација против ЊБ. Вакцинацијата може да ги елиминира клиничките знаци, но не и инфекцијата и размножувањето на вирусот^[15, 40, 136], поради тоа, по инфекцијата можно е ширењето на вирулентниот вирус да биде незабележано. Ова може да резултира со ендемска ситуација што станува видлива кога со вакцинација не може да се постигне доволен имунитетот, при грешки во вакцинацијата или при имунолошка супресија од други патогени агенси^[16]. Сојот *NDV/chicken/Macedonia/421/2005* иако изолиран, во 2005 година за време на епизоотијата низ целата држава^[57], тој е филогенетски посличен со сојот *NDV/chicken/Macedonia/082/2002*, изолиран во 2002 година. Може да се каже дека за епизоотијата на ЊБ во Македонија, во 2005/2006 година, одговорни се две различни претстави на вирулентни вируси, од коишто втората била претходно присутна кај

живината. Во прилог на ова е податокот за изолација на сојот *NDV/chicken/Macedonia/421/2005* и соевите *NDV/chicken/Macedonia/069/2005* и *NDV/chicken/Macedonia/070/2005*, во временска дистанца од не повеќе од 45 дена, на далечина од 19 km.

Соевите: *NDV/chicken/Macedonia/062/2005*, *NDV/starling/Macedonia/068/2006*, *NDV/chicken/Macedonia/069/2005*, *NDV/chicken/Macedonia/070/2005* и *NDV/chicken/Macedonia/071/2006*, откриени за време на опишаната епизоотија во 2005/2006 година ^[57] кај селската живина и сколовранците, меѓусебно се разликуваат во 1 – 2 нуклеотидни бази, а филогенетски се најслични со српските изолати од 2006 и 2007 година и со бугарските изолати од 2005, 2006, 2007, 2008 и 2009 година. Дел од српските изолати се мошне слични со изолатите од Романија, од 2008 и 2009 година – *Vidanovic* ^[178]. Врз основа на филогенетската анализа од нашиот труд, филогенетската анализа од *Vidanovic* ^[178] и податоците од *Alexander* ^[13], може да се претпостави дека во изминатиот период има појава на регионална епизоотија на генотипот VIIId, со нејзино прелевање од Македонија и Бугарија во Србија.

Наодот на вирулентен вирус кај сколовранци (*NDV/starling/Macedonia/068/2006*) укажува на присуство на вирусот во популацијата на диви птици, и ова не е необично бидејќи во Романија во 2007 година исто така е изолиран вирулентен вирус (VIIId) од сколовранец, со ИЦПИ од 1,7 ^[13]. Детекција на ВЊБ од сколовранец со изразени нервни знаци којшто бил лентоген за кокошките, опишана е од *Lipkind et al.* ^[111]. Вообичаено, од дивите птици многу почесто се изолираат лентогени вируси, и се смета дека тие се резервоар за истите ^[98]. Поголемиот број изолати на вирулентни вируси од дивите птици се резултат на земање мостри од пловисани птици, најдени мртви во близина на заразени одгледувалишта на живина ^[7]. Постојат три исклучоци од отсуството на ендемски вирулентни ВЊБ кај дивите птици: панзоотијата кај гулабите, кормораните во Северна Америка и повремените наод на ширење преку диви птици во Европа ^[13]. Кај последниот исклучок, причинители се вирусите од генотипот VIIb ^[15, 90]. За изолација на вирулентен VIIId вирус од кобец, гугутка, див гулаб и патка, како резултат на присуството на вирусот кај живината, известува *Vidanovic et al.* ^[177]. Веројатно е дека сколовранците се заразени како резултат на епизоотијата кај домашната живина и немаат улога во примарната појава и ширењето на вирусот кај домашната живина. Наодот од 30 мртви птици на едно место

значи дека настанало нагло пцовисување поради изразената вируленција на вирусот за сколовранците.

Соевите *NDV/chicken/Macedonia/069/2005* и *NDV/chicken/Macedonia/070/2005* се изолирани од кокошки од с. Могила, Битола каде што се забележува масовна смртност во целото село. Ова село е класичен пример како ЊБ, покрај огромни директни штети, предизвикува и индиректни социо-економски штети. Имено, од страна на мештаните и пазарциите, на жителите од ова село им е забранувано да го посетуваат пазарот во Битола и да купуваат и продаваат различна стока (лична комуникација). Примероците од коишто се изолирани овие соеви се земени на ист ден од два соседни дворови. Сепак, при преглед на нуклеотидната секвенција се забележува несинонимна нуклеотидна супституција $^{80}\text{C}\rightarrow\text{T}$, којашто резултира со конзервирана аминокиселинска супституција $^{12}\text{P}\rightarrow\text{S}$. За да сме сигурни во резултатот, дијагностичката постапка кај овие два соја е направена уште еднаш, од хомогенизација на органи преку класични и молекуларни методи до филогенетска анализа (слика 4.1.).

Врз основа на положбата и класифицирањето на класичните соеви на филогенетското стебло, може со голема сигурност да се каже дека постојат најмалку две рани независни внесувања на вирусите од генотипот VIIId во Македонија, во периодот 2002 – 2003 година, а можеби и порано, како и трето внесување коешто настанало веројатно подоцна, т.е. во текот на 2005 година. Продорот на вирусот, настанат во 2002 година, продолжил да циркулира барем до 2005 година, и доказ за тоа се соевите *NDV/chicken/Macedonia/080/2004* и *NDV/chicken/Macedonia/421/2005*, што укажува на ензоотско присуство на вирусот во период од најмалку 3 години.

Соевите: *NDV/pigeon/Macedonia/234/2007*, *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007*,
NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007, *NDV/pigeon/Macedonia/230/2008*,
NDV/pigeon/Macedonia/232/2008, *NDV/pigeon/Macedonia/962/2008*,
NDV/chicken/Macedonia/231/2010, *NDV/pigeon/Macedonia/2810/2010*,
NDV/pigeon/Macedonia/233/2011, *NDV/pigeon/Macedonia/415/2011*,
NDV/pigeon/Macedonia/419/2011 и *NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012*, врз основа на нуклеотидната секвенција на делот на Φ генот спаѓаат во генотипот VI, подгенотип VIb. Подгенотипот VIb е поделен на VIb/1 и VIb/2. Групата VIb/1 дополнително е поделена на ирачки вируси (IQ), рани европски (EU/ea), северноамерикански (NA) и неодамнешни

европски (EU/re) ^[176]. Според оваа класификација, македонските соеви спаѓаат во групата VIb/1 на неодамнешни европски соеви (EU/re). Оваа група на соеви (VIb/1), најверојатно потекнува од Северноисточна Африка ^[176].

Сите македонски соеви поседуваат аминокиселински мотив на МР на Ф генот ¹¹²*RRQKR*FIG*¹¹⁹, што ги класифицира во групата на вирулентни вируси ^[49], којшто е карактеристичен за ГПМВ-1, изолирани од 1990-тите години па наваму ^[123].

И покрај вакцинацијата, ГПМВ-1 вирусите се сè уште ензоотски во многу земји, и од нив покрај домашните гулаби заболуваат и дивите гулаби и птиците во зоолошките градини ^[3, 123]. Сојот *NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012* е изолиран од див гулаб во 2012 година. Поголемиот број ГПМВ-1 вируси поседуваат намалена вируленција за кокошките, но поради присуството на вирулентен мотив на МР на Ф генот, тие спаѓаат во групата на вирулентни соеви ^[3, 123, 176]. Тие се прилично заразни и можат да се пренесат од заразени гулаби на други гулаби или на живина одгледувана со неадекватни мерки на биосигурност. Живината инфицирана со ГПМВ-1 може да го разнесува вирусот и без присуство на клинички знаци. На тој начин, тие се константна закана за домашната живина. Токму сојот *NDV/chicken/Macedonia/231/2010*, иако изолиран од кокошка, врз основа на нуклеотидната секвенција спаѓа во ГПМВ-1 вирусите од генотипот VIb. Овој сој е филогенетски мошне сличен со другите ГПМВ-1, изолирани од гулаби во Македонија. Ако постои голем резервоар на ГПМВ-1 кај домашните и дивите гулаби и кај другите диви птици, ќе настане ширење и кај живината ^[13].

Врз основа на филогенетската анализа, може да се види дека соевите *NDV/pigeon/Macedonia/415/2011* и *NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012* покажуваат извесни разлики во однос на сите други македонски соеви. Притоа сојот *NDV/feral pigeon/Macedonia/9701/2012* е филогенетски поблизок со српските изолати од 2009 и 2010 година од гулаби отколку со македонските изолати.

Во 2007 година се изолирани три ГПМВ-1 соеви во две одгледувалишта од исто населено место (N 41°28'57. E 22°05'32.). Во првото одгледувалиште се изолирани два различни соеви (*NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007* и *NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007*), а во второто одгледувалиште е изолиран сој (*NDV/pigeon/Macedonia/234/2007*), којшто е идентичен со еден од соевите (*NDV/pigeon/Macedonia/1503/2007*) во првото одгледувалиште. Уште повеќе, сојот *NDV/pigeon/Macedonia/1501/2007* е идентичен со

сојот *NDV/pigeon/Macedonia/962/2008*, изолиран од сосема друг крај на Македонија (N 41°48'03. E 20°54'50.), а вториов пак се разликува од сојот *NDV/pigeon/Macedonia/230/2008*, којшто е изолиран од ист крај (N 41°49'59. E 20°52'58.).

Од филогенетското стебло направено за ГПМВ-1 се воочува дека нема јасна географска разграниченост на овие соеви на глобално ниво. Така, географски далечни соеви се филогенетски блиски. Ова пред сè се должи на спецификата на оваа гранка, каде има интензивно мешање на гулабите од различни географски локации како резултат на меѓународната и внатрешната трговија, изложбите на живи птици, трките со спортски гулаби итн.

Од исклучително значење е познавање на молекуларната структура и филогенетските карактеристики на ВЊБ, со цел да се препознаат ендемските соеви во еден регион, од што ќе зависи проценката на ризикот и примената на контролните мерки. Контролните мерки што ќе се применат, треба да бидат прилагодени на можностите на секоја земја. Добрата пракса на одгледување на живината и вакцинацијата треба да бидат проследени со добри организациски активности, тренинзи на стручните лица и фармерите и нивна меѓусебна комуникација.

7. ЗАКЛУЧОК

1. За валидна детекција и одредување на вируленцијата на ВЊБ, покрај класичните методи е потребно да се применат и молекуларни методи.
2. Врз основа на аминокиселинскиот мотив на МР на Ф генот, сите испитувани соеви во оваа студија се вирулентни вируси.
3. Сите откриени ВЊБ, во периодот 2002 – 2006 година во Македонија, се припадници на генотипот *VIII*d, вклучително и причинителите на епизоотијата во 2005 – 2006 година, а поседуваат филогенетска сличност со соевите од околните земји, изолирани во 2005, 2006 и 2007 година.
4. Вирусите откриени 2002 – 2003 година се едни од првите карактеризирани припадници на генотипот *VIII*d во Југоисточна Европа.
5. Вирулентните ВЊБ од генотипот *VIII*d се способни да предизвикаат клинички манифестно заболување кај вакцинирана комерцијална живина.
6. Во случај на епизоотија од пошироки размери со вирулентни ВЊБ, веројатноста да се докаже болеста кај дивите птици е поголема.
7. Сите изолирани ГПМВ-1, во периодот 2007 – 2012 година во Македонија, се припадници на генотипот *VI*b во групата на вируси коишто се појавени неодамна, а поседуваат филогенетска сличност со соеви од блиски и подалечни географски локации.

8. Во популацијата на домашни гулаби во Македонија, во одделни одгледувалишта постои мешање на филогенетски идентични или слични вируси, што може да доведе до засилување на клиничката слика.
9. Присуството на ГПМВ-1 кај популацијата на гулаби во Македонија претставува евидентирана закана за ширење на Њукастелската болест кај домашната живина.
10. Потребно е да се ревидира националната легислатива, имајќи ги предвид дефинициите за ЊБ на *OIE* и ЕУ, и да се прошири опсегот на Националната референтна лабораторија за АИ во Национална референтна лабораторија за АИ и ЊБ согласно европската лабораториска пракса, а врз основа на имплементираниите класични и молекуларни дијагностички методи.

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

Кратенка	Значење
µl	Микролитри
C	Цитозин
E	Глутаминска киселина
F	Фенилаланин
G	Гванин
G	Глицин
K	Лизин
L	Полимераза
L	Леуцин
ml	Милилитри
NCR	Некодирачки регион
NP	Нуклеопротеин
OIE	Светска организација за здравје на животните
P	Фосфопротеин
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Полимеразна верижна реакција
PPMV-1	Pigeon paramyxovirus type 1
Q	Глутамин
R	Аргинин
RT-PCR	Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во два чекора
RT-qPCR	Реверзна транскрипција и полимеразна верижна реакција во реално време, во еден чекор
T	Тимин
USDA	United States Department of Agriculture
A	Аденин
АИ	Авијарна инфлуенца
АИВ	Вирус на авијарна инфлуенца
АПМВ	Авијарен парамиксовирус
БП	Базни парови
ВЊБ	Вирус на Њукастелска болест
ГПМВ-1	Гулабов парамиксовирус тип 1
ДНК	Дезоксирибонуклеинска киселина
ЕКЈ	Ембрионирани кокошкини јајца
ЕУ	Европска унија
ИВПИ	Интравенозен патоген индекс
ИХА	Инхибиција на хемаглутинација
ИЦПИ	Интрацеребрален патоген индекс
кДНК	Комплементарна ДНК
M	Матрикс ген/протеин
мАт	Моноклонски антитела
МЗШВ	Министерство за земјоделство, шумарство и водостопанство

МР	Место на расекување
НП	Нуклеопротеин
ЊБ	Њукастелска болест
РНК	Рибонуклеинска киселина
РНП	Рибонуклеински протеински комплекс
САД	Соединети Американски Држави
УВ	Ултравioletови
Ф	Фузиски ген/протеин
ХА	Хемаглутинација
ХАЕ	Хемаглутинациска единица
ХН	Хемагултинин-неураминидаза
ЦК	Циклус на квантификација

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Alders, R., and Spradbrow, P., 2001. Controlling Newcastle Disease in Village Chickens: A Field Manual. ACIAR Monograph 84pp.
2. Aldous, E.W., and Alexander, D.J., 2001. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol* 30, 117–128.
3. Aldous, E.W., Fuller, C.M., Mynn, J.K., Alexander, D.J., 2004. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons. *Avian Pathol* 33, 258–269.
4. Aldous, E.W., Manvell, R.J., Cox, W.J. et al., 2007. Outbreak of Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*) in south-east England in July 2005. *Vet Rec* 160(14), 482-484.
5. Aldous, E.W., Mynn, J.K., Banks, J., Alexander, D.J., 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 Pathol* 32, 239–257.
6. Alexander, D.J., Manvell, R.J., and Parsons, G., 2006. Newcastle disease virus (strain Herts 33/56) in tissues and organs of chickens infected experimentally, *Avian Pathol* 35(02), 99-101.
7. Alexander, D.J., 2001. Newcastle disease The Gordon Memorial Lecture. *Br Poult Sci* 42, 5-22.
8. Alexander, D.J., Campbell, G., Manvell, R.J., Collins, M.S., Parsons, G., McNulty, M.S., 1992. Characterisation of an antigenically unusual virus responsible for two outbreaks of Newcastle disease in the Republic of Ireland in 1990. *Vet Rec* 130(4), 65-68.
9. Alexander, D.J., 1988. Newcastle disease: Methods of spread. In: DJ Alexander (ed) *Newcastle disease*. Kluwer Academic, Boston, MA, pp 256-272.

10. Alexander, D.J., 1998. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. In: A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens, Dufour-Zavala, D. E. Swayne, J. R. Glisson et al., Eds., pp. 135–141, American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, Fla, USA, 5th edition, 2008.
11. Alexander, D.J., 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech.* 19, 443–462.
12. Alexander, D.J., 2009. Ecology and epidemiology of Newcastle disease. In: *Diagnosis of Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual*. I Capua and D.J. Alexander (eds) pp (19-27) Springer-Verlag, Milan.
13. Alexander, D.J., 2011. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. *Avian Pathol* 40, 547-558.
14. Alexander, D.J., and Allan, W.H., 1974. Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathol* 3, 269-278.
15. Alexander, D.J., Banks, J., Collins, M.S., Manvell, R.J., Frost, K.M., Speidel, E.C., and Aldous, E.W., 1999. Antigenic and genetic characterisation of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Vet Rec* 145, 417-421.
16. Alexander, D.J., Bell, J.G. and Alders, R.G., 2004. A Technology Review: Newcastle Disease - With Special Emphasis on Its Effects on Village Chickens, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
17. Alexander, D.J., Koch, G., Kaleta, E.F., Guittet, M., Jorgensen, P.H., Meulemans, G., Werner, O., and Moynagh, J., 1998. The Definition of Newcastle Disease. XXIV/B3/AHAW/R01/1998 Report 01 of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare adopted 24.03.98. pp7. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out04_en.html
18. Alexander, D.J., Manvell, R.J., Kemp, P.A., Parsons, G., Collins, M.S., Brockman, S., Russell, P.H., and Lister, S.A., 1987. Use of monoclonal antibodies in the characterisation of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. *Avian Pathol* 16, 553-565.
19. Alexander, D.J., Manvell, R.J., Lowings, J.P., Frost, K.M., Collins, M.S., Russell, P.H. and Smith, J.E., 1997. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol* 26, 399-418.
20. Alexander, D.J., Russell, P.H., Parsons, G., Abu Elzein, E.M.E., Ballough, A., Cernik, K., Engstrom, B., Fevereiro, M., Fleury, H.J.A., Guittet, M., Kaleta, E.F., Kihm, U., Kusters, J., Lomniczi, B., Meister, J., Meulemans, G., Nerome, K., Petek, M., Pokomunski, S., Polten, B., Prip, M., Richter, R., Saghy, E., Samberg, Y., Spanoghe, L., and Tumova, B, 1985b. Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons-an international collaborative study. *Avian Pathol* 14, 365-376.

21. Alexander, D.J., Wilson, G.W.C., Russell, P.H., Lister, S.A., and Parsons, G., 1985. Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984. *Vet Rec* 117, 429–34.
22. Alexander, D.L., Aldous, E.W., and Fuller, C.M., 2012. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research, *Avian Pathol* 41(4), 329-335.
23. Allan, W.H., Lancaster, J.E., and Toth, B., 1978. Newcastle disease vaccines-their production and use. *FAO Animal Production Series No. 10*. FAO, Rome.
24. Antal, M., T. Farkas et al., 2007. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction detection of Newcastle disease virus using light upon extension fluorogenic primers, *J Vet Diagn Invest* 19(4), 400-4.
25. Asplin, F. D., 1952. Immunisation against Newcastle disease with a virus of low virulence (strain F) and observations on subclinical infection in partially resistant fowls. *Vet Rec* 64, 245-249.
26. Ballagi-Prodany, A., Wehmann, E., Herczeg, J., Belak, S., Lomniczi, B., 1996. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Arch Virol* 141, 243–261.
27. Barbezange, C., Jestin, V., 2002. Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. *J Virol Methods* 106, 197–207.
28. Beach, J.R., 1942. Avian pneumoencephalitis. *Proceedings of the Annual Meeting of the US Livestock Sanitary Association*, 46, 203-223.
29. Beach, J.R., 1944. The neutralization in vitro of avian pneumoencephalitis virus by Newcastle disease immune serum. *Science*, 100, 361-362.
30. Beard, C.W., and Hanson, R.P., 1984. Newcastle disease. In: *Diseases of Poultry* 8th Edit., M.S.
31. Hofstad, H.J. Barnes, B.W. Calnek, W.M. Reid, and H.W. Yoder Eds, Iowa State University Press, Ames, pp. 452-70.
32. Bell, J.G. (2001). A comparison of the different vaccine available for the control of Newcastle disease in village chickens. In: Alders, R.G. and Spradbrow, P.B. ed., *SADC Planning Workshop on Newcastle disease control in village chickens. Proceedings of an International Workshop*, Maputo, Mozambique, 6-9 March, 2000. *ACIAR Proceedings No. 103*, pp. 56-60.
33. Biancifiori, F., and Fioroni, A., 1983. An occurrence of Newcastle disease in pigeons: virological and serological studies on the isolates. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 6, 247–252.
34. Bissonnette, M.L.Z., Donald, J.E., DeGrado, W.F., Jardetzky, T.S., and Lamb, R.A., 2009. Functional analysis of the transmembrane domain in paramyxovirus F protein-mediated membrane fusion. *J Mol Biol* 386(1), 14–36.

35. Bogoyavlenskiy, A., Berezin, V., Prilipov, A., Usachev, E., Lyapina, O., Levandovskaya, S., Korotetskiy, I., Tolmacheva, V., Makhmudova, N., Khudyakova, S., Tustikbaeva, G., Zaitseva, I., Omirtaeva, E., Ermakova, O., Daulbaeva, K., Asanova, S., Kydyrmanov, A., Sayatov, M., and King, D., 2005. Molecular characterization of virulent Newcastle disease virus isolates from chicken during the 1998 NDV outbreaks in Kazakhstan. *Virus Genes* 31, 13–20.
36. Briand, F-X., Henry, A., Massin, P., and Jestin, V., 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus. *J Virol* 86(14), 7710.
37. Brown, I.H., 2011. Country Reports on Newcastle disease and other APMV infections for 2010 based on responses to the questionnaire. Joint 17th Annual Meetings of the National Laboratories for Newcastle Disease and Avian Influenza of EU Member States Brussels, Belgium.
http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/docs/programme17th_2011_en.pdf.
38. Brueckner, A.L., Reagan, R.L., Schenck, D.M., Werner, B.S., Hickman, J.W., 1950. Mammalian adaptation of Newcastle disease virus. In: *Proceedings book, AVMA*. pp 163–165.
39. Burnet, F.M., 1943. Human infection with the virus of Newcastle disease of fowl. *Med J Aust* 2, 313–314.
40. Capua, I., Scacchia, M., Toscani, T., and Caporale, V., 1993. Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls' eggs. *J Vet Med B* 40, 609-612.
41. Cattoli, G., De Battisti C., Marciano, S., Ormelli, S., Monne, I., Terregino, C., Capua, I., 2009. False-Negative Results of a Validated Real-Time PCR Protocol for Diagnosis of Newcastle Disease Due to Genetic Variability of the Matrix Gene. *J Clin Microbiol* 47(11), 3791–3792.
42. Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C., and Brown, C., 2011. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diagn Invest* 23, 637.
43. CEC, 1992. Council Directive 92/66/EEC of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease. *Official Journal of the European Communities* L 260.
44. Chang, P.W., 1981. Newcastle disease. In: Beran GW (ed) *CRC handbook series in zoonoses section B: Viral zoonoses, volume II*. CRC, Baton Raton pp261-274.
45. Chen, J-P., and Wang C-H., 2002. Clinicaepidemiological and experimental evidence for the transmission of Newcastle disease virus thorough eggs. *Avian Dis* 46, 461-465.
46. Choi, K-S., Lee, E-K., Jeon, W-J., Nah, J-J., Kim, Y-J., Lee, M-Y., Lee, H., and Kwon, J-H., 2008. Isolation of a Recent Korean Epizootic Strain of Newcastle Disease Virus from Eurasian Scops Owls Affected with Severe Diarrhea. *J Wildl Dis* 44(1), 193–198.

47. Choppin, P.W., Scheid, A., 1980. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev Infect Dis* 2, 40-61.
48. Collins, M.S., Alexander, D.J., Brockman, S., Kemp, P.A., Manvell, R.J., 1989. Evaluation of mouse monoclonal antibodies raised against an isolate of the variant avian paramyxovirus type 1 responsible for the current panzootic in pigeons. *Arch Virol* 104, 53–61.
49. Collins, M.S., Bashiruddin, J.B., Alexander, D.J., 1993. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in anti- genicity and pathogenicity. *Arch Virol* 128, 363-70.
50. Collins, M.S., Franklin, S., Strong, I, Meulemans, G., and Alexander, D.J., 1998. Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. *Avian Pathol* 27, 90-96.
51. Collins, M.S., Strong, I, Alexander, D.J., 1996. Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed “pigeon PMV-1 viruses” based on the nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Arch Virol* 141, 635–647.
52. Colman, P.M. et al., 1993. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutininneuraminidase with influenza virus neuramidase. *J. Virol.* 67, 2972–2980.
53. Czegledi, A., Ujvari, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O. and Lomniczi, B, 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research* 120, 36-48.
54. Dardiri, A.H., Yates, V.M., Flanagan, T.D., 1962. The reaction to infection with the B1 strain of Newcastle disease virus in man. *Am J Vet Res* 23, 918–921.
55. De Battisti C., Salomoni, A., Ormelli, S., Monne, I., Capua, I., Cattoli, G., 2013. Rapid pathotyping of Newcastle Disease Virus by pyrosequencing *J Virol Methods* 188 13–20.
56. de Leeuw, O., and Peeters, B., 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae *J Gen Virol* 80, 131–136.
57. Dodovski, A., Dodovski, M., Mitrov, D., Naletoski, I., Blagoevska, K., 2007. Newcastle Disease in Backyard Poultry in Republic of Macedonia in 2005-2006. *Proceedings of 15th World Veterinary Poultry Congress, Beijing, China.*
58. Dortmans, J.C.F.M., Koch, G., Rottier, P.J.M., Peeters, B.P.H., 2009. Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. *J Gen Virol* 90, 2746-2750.
59. Dortmans, J.C.F.M., Koch, G., Rottier, P.J.M., Peeters, B.P.H., 2011. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet Res* 42, 122.
60. Dortmans, J.C.F.M., Rottier, P.J.M., Koch, G., Peeters, B.P.H., 2010. The viral replication complex is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *J Virol* 84, 10113-10120.

61. Doyle, T.M., 1927. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 40, 144-169.
62. Doyle, T.M., 1935. Newcastle disease of fowls. *J Comp Pathol Ther* 48, 1-20.
63. Erickson, G.A., Mare, C.J., Gustafson, G.A., Miller, L.D., Protor, S.J., and Carbrey, E.A., 1977. Interactions between viscerotropic velogenic Newcastle disease virus and pet birds of six species. 1. Clinical and serologic responses, and viral excretion. *Avian Dis* 21, 642-654.
64. Evans, A.S., 1955. Pathogenicity and immunology of Newcastle disease virus (NDV) in man. *Am J Public Health* 45, 742–745.
65. Francis, D.W., 1973. Newcastle and psittacines, 1970-71. *Poultry Digest* 32, 16-19.
66. Fuller, C. M., Brodd, L., Irvine, R. M., Alexander, D. J., and Aldous, E. W., 2010. Development of an L gene real-time Reverse- Transcription PCR assay for the detection of Avian Paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples. *Arch Virol* 155(6), 817-23.
67. Fuller, C.M., Collins, M.S. Alexander, D.J., 2009. Development of a real-time reverse-transcription PCR for the detection and simultaneous pathotyping of Newcastle disease virus isolates using a novel probe. *Arch Virol* 154(6), 929 – 937.
68. Garten, W., Berk, W., Nagai, Y., Rott, R., Klenk, H.D., 1980. Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity. *J Gen Virol*, 50, 135-147.
69. Glickman, R.L., Syddall, R.J., Iorio, R.M., Sheehan, J.P., Bratt, M.A., 1988. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J Virol* 62, 354-356.
70. Gohm, D.S., Thur, B. and Hofmann, M.A., 2000. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathol* 29, 143–152.
71. Gould, A.R., Kattenbeltd, J.A., Selleck, P., Hansson, E., Della-Porta, A. J., and Westbury, H. A., 2001. Virulent Newcastle disease in Australia: Molecular analysis of viruses isolated prior to and during the outbreak of 1998 – 2000. *Virus Res* 77, 51-60.
72. Halasz, F., 1912. Contributions to the knowledge of fowlpest. *Veterinary Doctoral Dissertation, Communications of the Hungarian Royal Veterinary School, Patria, Budapest.* pp. 1-36.
73. Hanson, R.P., 1972. World wide spread of viscerotropic Newcastle disease. *Proceedings of the 76th Meeting of the US Animal Health Association, Florida.* pp. 276–279.
74. Hanson, R.P., 1978. Newcastle disease, in: Hofstad, M.S., Calnek, B.W., Helmboldt, C.F., Reid, W.M. and Yoder, H.W. (Eds) pp. 513–535. *Diseases of Poultry*, (Iowa State University Press).

75. Herczeg, J., Wehmann, E., Bragg, R., Travassos Dias, P.M., Hadjiev, G., Werner, O., Lomniczi, B., 1999. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Arch Virol* 144(11), 2087-2099 .
76. Higgins, D.A., and Shortridge, K.F., 1988. Newcastle disease in tropical and developing countries. In: D.J. Alexander (ed.). *Newcastle Disease*. Kluwer Academic Publishers: Boston. MA, 273-302.
77. Hines, N.L. and Miller, C.L., 2012. Avian Paramyxovirus Serotype-1: A Review of Disease Distribution, Clinical Symptoms, and Laboratory Diagnostics, *Vet Med Int* Article ID 708216, 17 pages.
78. Hitchner, S. B., and Johnson, E. P., 1948. A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease (avian pneumoencephalitis). *Vet Med* 43, 525-530.
79. Hofstad, M.S., 1950. Experimental inoculation of swine and sheep with Newcastle disease virus. *Cornell Vet* 40, 190–196.
80. http://web.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=122andc_mald=17#, accessed 11.03.2013
81. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>, accessed 15.03.2013
82. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countryreports, accessed 11.03.2013
83. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReportandreportid=6183, accessed 11.03.2013
84. Hu, S., Ma, H., Wu, Y., Liu, W., Wang, X., Liu, Y., Liu, X., 2009. A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine* 27, 904-910.
85. Hu, X., et al., 1992. Functional interactions between the fusion protein and hemagglutininneuraminidase of human parainfluenza viruses. *J Virol* 66, 1528–1534.
86. Huang, Z., Krishnamurthy, S., Panda, A., and Samal, S. K., 2003. Newcastle Disease Virus V Protein Is Associated with Viral Pathogenesis and Functions as an Alpha Interferon Antagonist. *J Virol* 77(16), 8676-85.
87. Huang, Z., Panda, A., Elankumaran, S., Govindarajan, D., Rockemann, D.D., and Samal, S.K., 2004. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J Virol* 78(8), 4176– 4184.
88. Hupbauer, A., Topolnik, E., 1944. Kuga peradi ustanovljena kod nas. *Veterinarski arhiv* 14, 1-35.
89. Jestin, V., Jestin, A., 1991. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). *Arch Virol* 118, 151-61.
90. Jørgensen, P.H., Jensen Handberg, K., Ahrens, P., Hansen, H.C., Manvell, R.J., and Alexander, D.J., 1999. An outbreak of Newcastle disease in free-living pheasants (*Phasianus colchicus*). *J Vet Med B* 46, 381-387.

91. Kaleta, E.F., 1992. Paramyxoviruses in free-living and captive birds, a brief account. In: Kaleta, E.F., Heffels-Redmann, U. (Eds.), Workshop on Avian Paramyxoviruses, vol. 27-29. Rauschholzhausen, Germany, 262-271.
92. Kaleta, E.F., Alexander, D.J. and Russell, P.H., 1985. The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? *Avian Pathol* 14, 553–557.
93. Kaleta, E.F., and Baldauf, C., 1988. Newcastle disease in free-living and pet birds. In D.J. Alexander (Ed.). *Newcastle Disease* (pp. 197_246). Boston: Kluwer Academic Publishers.
94. Kant, A., Koch, G., Van Roozelaar, D.J., et al., 1997. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol* 26, 837–849.
95. Kim, L. M., Suarez, D.L., and Afonso, C.L., 2008. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagn Invest* 20(4), 414–425.
96. Kim, L.M., Afonso, C.L., Suarez, D.L., 2006. Effect of probe-site mismatches on detection of virulent Newcastle disease viruses using a fusion-gene real-time reverse transcription polymerase chain reaction test. *J Vet Diagn Invest* 18, 519–528.
97. Kim, L.M., King, D.J., Guzman, H., Tesh, R.B., Travassos da Rossa, A.P.A., Bueno, R., Dennet, J.A., Afonso, C.L., 2008. Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves. *J Clin Microbiol* 46, 3303–3310.
98. Kim, L.M., King, D.J., Suarez, D.L., Wong, C.W., Afonso, C.L., 2007. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 45, 1310–1314.
99. King, N., 2010. Methods in molecular biology, RT-PCR protocols, in *Springer Protocols*, pp. 199–201, Humana Press, New York, NY, USA, 2nd edition.
100. Klenk, H-D., Garten, W., 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 2, 39-43.
101. Kolakofsky, D., E. Boy de la Tour, Delius H., 1974. Molecular weight determination of Sendai and Newcastle disease virus RNA. *J Virol* 13(2), 261-268.
102. Kouwenhoven: 1993, Newcastle disease. In: *Virus infection of birds*, ed. McFerran JB, McNulty MS, pp. 341–361. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
103. Kraneveld, F.C., 1926. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Nederlands-Indische Bladen voor Diergeneeskunde* 38, 448-450.
104. Krapež, U., Fratnik Steyer, A., Slavec, B., Barlič-Maganja, D., Dovč, A., Račnik, J., and Zorman Rojs, O., 2010. Molecular Characterization of Avian Paramyxovirus Type 1 (Newcastle Disease) Viruses Isolated from Pigeons Between 2000 and 2008 in Slovenia. *Avian Dis* 54(3), 1075-1080.

105. Kuiken, T., 1998. Newcastle disease and other causes of mortality in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). PhD Thesis University of Saskatchewan, 174 p.
106. Lamb, R.A., 1993. Paramyxovirus fusion: a hypothesis of changes. *Virology* 197, 1–11.
107. Lamb, R.A., and Kolakofsky, D., 1996. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology* (Vol. 1) (Fields, B.N. et al., eds), 1177–1206.
108. Lamb, R.A., Paterson, R.G., and Jardetzky, T.S., 2006. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344(1), 30–37.
109. Levine, P.P., 1964. World dissemination of Newcastle disease, in: HANSON, R.P. (Ed) Newcastle disease, an evolving pathogen, pp. 65–69. (Madison, WI, University of Wisconsin Press).
110. Li, Q., Xue, C., Qin, J., et al., 2009. An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of Newcastle disease virus. *Arch Virol* 154, 1433–1440.
111. Lipkind, M., Rivetz, B., and Shihmanter, E., 1987. The first isolation of Newcastle disease virus (NDV) from free flying birds in Israel: comparative studies on NDV strain isolated from migrating starlings (*Sturnus vulgaris*) wintering in Israel. *Comp Immunol Microb* 10, 65-70.
112. Lister, S.A., Alexander, D.J., Hogg, R.A., 1986. Evidence for the presence of avian paramyxovirus type 1 in feral pigeons in England and Wales. *Vet. Rec.* 118, 476-479.
113. Liu, H., Wang, Z., Song, C., Wang, Y., Yu, B., Zheng, D., Chengying Sun, and Yangong Wu, 2006. Characterization of Pigeon-Origin Newcastle Disease Virus Isolated in China. *Avian Dis* 50(4), 636-640.
114. Liu, H., Wang, Z., Wang, Y., Sun, C., Zheng, D., and Wu, Y., 2008. Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Waterfowl in China. *Avian Dis* 52(1), 150-155.
115. Liu, X.F., Wan, H.Q., Ni, X.X., Wu, Y.T., Liu, W.B., 2003. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Arch Virol* 148(7), 1387-1403.
116. Lomniczi, B., Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordany, A., Kaleta, E.F., Werner, O., Meulemans, G., Jorgensen, P.H., Mante, A.P., Gielkens, A.L., et al., 1998. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* 143(1), 49-64.
117. Lukarev, T., Dodovski, M., Pejkovski, C., Prodanov, R., 1985. Suzbijanje kuge peradi u intenzivnom tovu curaka. *Perutninarski dnevi, Ljubljana*.
118. Lukarev, T., Dodovski, M., Pejkovski, C., Prodanov, R., Stiglic, N., Trencsev, D., 1982. Vakcinacija sprej metodom protiv atipicne kuge peradi drzane na ekstenzivan nacin. *Praxis Veterinaria*, 5-6.
119. Macpherson, L.W., 1956. Some observations on the epizootiology of Newcastle disease. *Can J Comp Med* 20, 155-168.

120. Makkay, A.M., Krell, P.J. & Nagy, E., 1999. Antibody detection-based differential ELISA for NDV-infected or vaccinated chickens versus NDV HN-subunit vaccinated chickens. *Vet Microbiol* 66(3), 209-22.
121. Mayo, M.A., 2002. Virus Taxonomy—Houston 2002. *Arch Virol* 147, 1071–1076.
122. Meulemans, G., Gonze, M., Carlier, M.C., Petit, P., Burny, A., and Long, L., 1987. Evaluation of the use of monoclonal antibodies to hemagglutination and fusion glycoproteins of Newcastle disease virus for virus identification and strain differentiation purposes. *Arch Virol* 92, 55-62.
123. Meulemans, G., Van den Berg, T.P., Decaesstecker, M., Boschmans, M., 2002. Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathol* 31, 515-519.
124. Miller, P.J. Kim, M.L., Ip, H.S., Afonso, C.L., 2009. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology* 391, 64–72.
125. Miller, P.J., Afonso, C.L., Spackman, E., Scott, M.A., Pedersen, J.C., Senne, D.D., Brown, J.D., Fuller, C.M., Uhart, M.M., Karesh, W.B., Brown, I.H., Alexander, D.J., and Swayne, D.E., 2010a. Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype 10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J Virol* 84(21), 11496–11504.
126. Miller, P.J., Decanini, E.L., Afonso, C.L., 2010b. Review Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect Genet Evol* 10, 26–35.
127. Morgan, R.W., Gelb, J., Pope, C.R. & Sondermeijer, P.J., 1993. Efficacy in chickens of a herpesvirus of turkeys recombinant vaccine containing the fusion gene of Newcastle disease virus: onset of protection and effect of maternal antibodies. *Avian Dis* 37, 1032-1040.
128. Morrison, T.G., 2003. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim Biophys Acta* 1614(1), 73–84.
129. Nagai, Y., Klenk, H.D., 1977. Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage. *Virology* 77, 125-134.
130. Nagai, Y., Klenk, H.D., Rott, R., 1976. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72, 494-508.
131. Naletoski, A., Lukarev, T., Micevski C., Pejkovski, C., Dodovski, M., 1972. Titar antitela atipicne kuge peradi kod pilica do 21 dan nakon vagenja i njihova otpomost na infekciju. *Zivinarski dani, Zbornik* 271. Beograd.
132. Ogasawara, T., Gotoh, B., Suzuki, H., Asaka, J., Shimokata, K., Rott, R., Nagai, Y., 1992. Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *EMBO J* 11, 467-472.
133. OIE Handistatus II http://web.oie.int/hs2/sit_mald_freq_pl.asp?c_cont=4andc_mald=17 accessed 21,04,2013.
134. Panda, A., Huang, Z., Elankumaran, S., Rockemann, D.D., Samal, S.K., 2004. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathog* 36, 1-10.

135. Panigrahy, B., Senne, D.A., Pearson, J.E., Mixson, M.A. and Cassidy, D.R., 1993. Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. *Avian Dis* 37, 254-258.
136. Parede, L., and Young, P.L., 1990. The pathogenesis of velogenic Newcastle disease virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. *Avian Dis* 34, 803-808.
137. Pearson, J.E., Senne, D.A., Alexander, D.J., Taylor, W.D., Peterson, L.A., and Russell, P.H., 1987. Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. *Avian Dis* 31, 105-111.
138. Pedersden, K.A., Sadasiv, E.C., Chang, P.W., Yates, V.J., 1990. Detection of antibody to avian viruses in human populations. *Epidemiol Infect* 104, 519-525.
139. Peeters, B.P.H., de Leeuw, O.S., Koch, G., and Gielkens, A.L., 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* 73, 5001–5009.
140. Peeters, B.R., Gruijthuijsen, Y.K., de Leeuw, O.S., Gielkens, A.L., 2000. Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. *Arch Virol* 145, 1829-1845.
141. Pham, H.M., Konnai, S., Usui, T., et al., 2005. Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis. *Arch Virol* 150, 2429–2438.
142. Pham, H.M., Nakajima, C., Ohashi, K., Onuma, M., 2005. Loopmediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *J Clin Microbiol* 43, 1646–1650.
143. Pospisil, Z., Zendulkova, D., and Smid, B., 1991. Unexpected emergence of Newcastle disease virus in very young chicks. *Acta Vet Brno* 60, 263-270.
144. Qin, Z.M., Tan, L.T., Xu, H.Y., Ma, B.C., Wang, Y.L., Yuan, X.Y., and Liu, W.J., 2008. Pathotypical Characterization and Molecular Epidemiology of Newcastle Disease Virus Isolates from Different Hosts in China from 1996 to 2005. *J Clin Microbiol* 46(2), 601–611.
145. Qiu, X., Sun, Q., Wu, S., Dong, L., Hu, S., Meng, C., Wu, Y., Liu, X., 2011. Entire genome sequence analysis of genotype IX Newcastle disease viruses reveals their early-genotype phylogenetic position and recent-genotype genome size. *Virol J* 8, 117.
146. Quinn, R.W., Hanson, R.P., Brown, J.W., Brandly, C.A. 1952. Newcastle disease virus in man. Results of studies in five cases. *J Lab Clin Med* 40, 736–743.
147. Raszevska, H., 1964. Occurrence of the La Sota strain NDV in the reproductive tract of laying hens. *Bull Vet Inst Pulawy* 8, 130-136.
148. Reagan, R.L., Lillie, M.G., Poelma, L.J., Brueckner, A.L., 1947. Transmission of virus of Newcastle Disease to the Syrian Hamster. *Am J Vet Res* 8, 136–138.

149. Romer-Oberdorfer, A., Veits, J., Werner, O., and Mettenleiter, T.C., 2006. Enhancement of pathogenicity of Newcastle disease virus by alteration of specific amino acid residues in the surface glycoproteins F and HN. *Avian Dis* 50, 259-263.
150. Römer-Oberdorfer, A., Werner, O., Veits, J., Mebatsion, T., Mettenleiter, T.C., 2003. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J Gen Virol* 84, 3121-3129.
151. Ronaghi, M., 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11, 3-11.
152. Sakaguchi, T., Toyoda, T., Gotoh, B., Inocencio, N.M., Kuma, K., Miyata, T., Nagai, Y., 1989. Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* 169(2), 260-72.
153. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74(12), 5463-5467.
154. Savic, V., 2003, Genetic characterization of Newcastle disease virus strains isolated in Croatia and neighboring countries, doctoral dissertation, University in Zagreb, 89 p.
155. Seal, B.S., King, D.J. and Meinersmann, R.J., 2000a. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Res* 66, 1-11.
156. Seal, B.S., King, D.J., and Bennett, J.D., 1995. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J Clin Microbiol* 33(10), 2624-2630.
157. Seal, B.S., King, D.J., and Sellers, H.S., 2000b. The avian response to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol* 24, (2-3), 257-268.
158. Senne, D.A., J.E. Pearson, L.D. Miller and G.A. Gustafson., 1983. Virus isolations from pet birds submitted for importation into the United States. *Avian Dis* 27, 731-44.
159. Senne, D.A., Pearson, J.E., Miller, L.D., and Gustafson, G.A., 1983. Virus isolations from pet birds submitted for importation into the United States. *Avian Dis* 27, 731-44.
160. Sergel, T., et al., 1993. The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation. *Virology* 193, 717-726.
161. Sharma, B., Pokhriyal, M., Rai, G.K., Saxena, M., Ratta, B., Chaurasia, M., Yadav, B.S. Sen, A., Mondal, B., 2012. Isolation of Newcastle disease virus from a non-avian host (sheep) and its implications. *Arch Virol* 157(8), 1565-7.
162. Snoeck, C.J., Ducatez, M.F., Owoade, A.A., Faleke, O.O., Alkali, B.R., Tahita, M.C., Tarnagda, Z., Ouedraogo, J.B., Maikano, I., Mbah, P.O., et al. 2009. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Arch Virol* 154, 47-54.
163. Spickler, A.R., and Roth, J.A., 2008. Iowa State University, College of Veterinary Medicine - <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.htm>

164. Spradbrow, P.B., 1993. Newcastle disease in village chickens. *Poult Sci Rev* 5, 57–96.
165. Srinivasappa, G.B., Snyder, D.B., Marquardt, W.W., King, D.J., 1986. Isolation of a monoclonal antibody with specificity for commonly employed vaccine strains of Newcastle disease virus. *Avian Dis* 30(3), 562-567.
166. Steward, M., Vipond, I.B., Millar, N.S., Emmerson, P.T., 1993. RNA editing in Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 74, 2539-2547.
167. Susta, L., Miller, P.J., Afonso, C.L., Brown, C.C., 2011. Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Vet Pathol* 48, 349-360.
168. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4⁰. *Mol Biol Evol* 24, 1596 – 1599.
169. Tan, S. W., Ideris A., Omar A. R. Yusoff K. Hair-Bejo M., 2009. Detection and differentiation of velogenic and lentogenic Newcastle disease viruses using SYBR Green I real-time PCR with nucleocapsid gene-specific primers. *J Virol Methods* 160(1-2), 149-56.
170. Tan, S.W., Omar, A.R., Aini, I., Yusoff, K., Tan, W.S., 2004. Detection of Newcastle disease virus using a SYBR Green I real time polymerase chain reaction. *Acta Virol* 48(1), 23-28.
171. Terregino, C., Capua, I., 2009. Conventional diagnosis of Newcastle disease virus infection. In: *Avian influenza and Newcastle disease*, ed. Capua I, Alexander DJ, pp. 123–125. Springer Milan, Milan, Italy.
172. Terregino, C., Cattoli, G., Grossele, B., Bertoli, E., Tisato, E., Capua, I., 2003. Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Avian Pathol* 32(1), 63–68.
173. Tong, S. and Compans, R.W., 1999. Alternativemechanisms of interaction between homotypic and heterotypic parainfluenza virus HN and F proteins. *J Gen Virol* 80(1), 107–115.
174. Toyoda, T., Sakaguchi, T., Hirota, H., Gotoh, B., Kuma, K., Miyata, T., and Nagai, Y., 1989. Newcastle disease evolution: II. Lack of recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* 169, 273-282.
175. Tsai, H.J., Chang, K.H., Tseng, C.H., Frost, K.M., Manvell, R.J., Alexander, D.J., 2004. Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Vet Microbiol* 104, 19–30.
176. Ujvari, D., Wehmann, E., Kaleta, E.F., Werner, O., Savic, V., Nagy, E., Czifra, G., Lomniczi, B., 2003. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. *Virus Res* 96, 63-73.
177. Vidanovic, D. Sekler, M., Ruzica, A., Milic, N., Nisavic, J., Petrovic, T., and Savic, V. 2011. Characterization of velogenic Newcastle disease viruses isolated from dead wild birds in Serbia during 2007. *J Wildlife Dis* 47(2), 433–441

178. Vidanovic, D., 2011, Uporedno ispitivanje valjanosti standardnih i molekularnih metoda u identifikaciji izolovanih sojeva virusa newcastle bolesti živine i divljih ptica, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 115 p.
179. Wakamatsu, N., King, D.J., Kapczynski, D.R., et al., 2006. Experimental pathogenesis for chickens, turkeys, and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002–2003. *Vet Pathol* 43, 925–933.
180. Wakamatsu, N., King, D.J., Seal, B.S., Samal, S.K., Brown, C.C., 2006. The pathogenesis of Newcastle disease: a comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. *Virology*, 353, 333-343.
181. Walker, J.W., Heron, B.R., and Mixson, M.A., 1973. Exotic Newcastle disease eradication programme in the United States of America. *Avian Dis* 17, 486-503.
182. Wang, Z., Liu, H., Xu, J., Bao, J., Zheng, D., Sun, C., Wei, R., Song, C., and Chen, J., 2006. Genotyping of Newcastle Disease Viruses Isolated from 2002 to 2004 in China. *Ann NY Acad Sci* 1081, 228–239.
183. Wehmann, E., Ujvari, D., Mazija, H., Velhner, M., Ciglar-Grozdanic, I., Savic, V., Jermolenko, G., Cac, Z., Prukner-Radovic, E., Lomniczi, B., 2002. Genetic analysis of Newcastle disease virus strains isolated in Bosnia-Herzegovina, Croatia, Slovenia and Yugoslavia reveals the presence of only a single genotype V, between 1979 and 2002. *Vet Microbiol* 94, 269–281.
184. Westbury, H., 2001. Newcastle disease virus: an evolving pathogen? *Avian Pathol* 30, 5–11.
185. Wise, M.G., Suarez, D.L., Seal, B.S., Pedersen, J.C., Senne, D.A., King, D.J., Kapczynski, D.R., and Spackman E., 2004. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 42(1), 329–338.
186. Wobeser, G., Leighton, F.A., Norman, R., Myers, D.J., Onderka, D., Pybus, M.J., Neufeld, J.L, Fox, G.A., and Alexander, D.J., 1993. Newcastle disease in wild water birds in western Canada. *Can Vet J* 34, 353-359.
187. World Organization for Animal Health (OIE), 2009. Newcastle Disease Technical Disease Card. OIE, Paris, France.
188. World Organization for Animal Health (OIE), 2012. Chapter 2.3.14 Newcastle Disease. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, version adopted May 2012. OIE, Paris, France.
189. Yang, C.Y., et al., 1999. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe. *Avian Dis* 43, 125–130.
190. Yates, V.J., Dorothy, E.F., Henderson, B.W. Jr., 1952. Isolation of Newcastle disease virus from a calf. *J Am Vet Med Assoc* 120, 149–150.

191. Yi, J., Liu, C., Chen, B., and Wu, S., 2011. Molecular Characterization of a Virulent Genotype VIIId Strain of Newcastle Disease Virus from Farmed Chickens in Shanghai. *Avian Dis* 55, 279–284.
192. Young, M., Alders, R., Grimes, S., Spradbrow, P., Dias, P., da Silva, A. and Lobo, Q., 2002. Controlling Newcastle Disease in Village Chickens: A Laboratory Manual. *ACIAR Monograph No. 87*, 142pp.
193. Yuan, X., Wang, Y., Yang, J., Xu, H., Zhang, Y., Qin, Z., Ai, H., Wang, J., 2012. Genetic and biological characterizations of a Newcastle Disease Virus from swine in China. *Virol J* 9, 129.
194. Yusoff, K. and Tan, W.S., 2001. NDV: macromolecules and opportunities. *Avian Pathol* 30, 439-455.
195. Анонимен, 1945. Книга на епизоотии при Министерството за земјоделие на НР Македонија.
196. Граматиковски, Г., и Стојановски, Б., 1985. Чума кај птиците. Во: Епизоотиолошка слика на заразните болести во СР Македонија 1927-1977, стр. 137-140.
197. Додовски, М., Митевски, Д., Проданов, Р., Додовска, К., Лукарев, Т., 1998. Епизоотиолошката состојба кај живината во Република Македонија и нивна имунопрофилактика. VI Македонски живинарски денови.
198. Правилник за мерките за сузбивање и искоренување на Њукастл-болеста кај перната живина, 1988. Службен лист на СФРЈ, број 39 стр. 1101.
199. Цеков, А., 1956. Чума по домашните птици. Во: Десет години работа на ветеринарната служба во НР Македонија (1945-1954), стр. 56-58.
200. Цеков, А., и Шијаков, И., 1966. Чума кај домашните птици. Во: Втора деценија работа на ветеринарната служба во СР Македонија (1955-1964), стр. 41-43.
201. Цеков, А., и Шијаков, И., 1976. Чума кај домашните птици. Во: Трета деценија работа на ветеринарната служба во СР Македонија (1965-1974).
202. Цеков, А., Шијаков, И., Поповски, Н., 1985. Атипична чума кај живината. Во: Четврта деценија работа на ветеринарната служба во СР Македонија (1975-1984), стр. 54-57.