DOI: 10.22092/VJ.2021.353792.1827
شماره ۱۳۴ بهار ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

نقش ویروس بیماری نیوکاسل در سندرم‌های تنفسی گله‌های جوجه گوشتی استان‌های خوزستان و اصفهان

• **فروغ مکی**
گروه بهداشت و بیماری‌های طیور، بخش بهداشت و بیماری‌های طیور گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **زهرا برومند (نویسنده مسئول)**
گروه بهداشت و بیماری‌های طیور، بخش بهداشت و بیماری‌های طیور گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **منصور میاحی**
گروه بهداشت و بیماری‌های طیور، بخش بهداشت و بیماری‌های طیور گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **مسعودرضا صیفی‌آباد شاپوری**
گروه ویروس‌شناسی، بخش میکروبیولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۱۲-۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۰۲-۰۵
Emali: z.boroomand@scu.ac.ir

چکیده

بیماری نیوکاسل به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت طیور، خسارات اقتصادی فراوانی به همراه دارد. پژوهش حاضر به هدف بررسی نقش ویروس بیماری نیوکاسل در سندرم‌های تنفسی گله‌های جوجه گوشتی، در استان‌های خوزستان و اصفهان می‌باشد. بدین منظور از بافت‌های نای، ریه و لوزه‌های سکومی ۲۰ گله جوجه‌ی گوشتی (هر استان ۱۰ گله) دارای علایم تنفسی در مناطق مختلف این دو استان نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌ها به تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ تا ۱۱ روز تلقیح شدند. واکنش RT-PCR برای ردیابی ویروس بیماری نیوکاسل بر روی مایع آلانتوئیک انجام شد. از ۲۰ گله مورد مطالعه، این ویروس در نه گله جداسازی و شناسایی شد. توالی ۳۳۰ نوکلئوتیدی در ناحیه شکست ژن F ویروس، در نه جدایه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون RT-PCR حاکی از جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل از سندرم‌های تنفسی در ۵۰٪ گله‌های گوشتی استان خوزستان و ۴۰٪ گله‌های گوشتی استان اصفهان بود. از نه جدایه‌ی مذکور، سه مورد در ژنوتیپ II و شش مورد در تحت ژنوتیپ VIId از کلاس II ویروس بیماری نیوکاسل قرار گرفتند و جدایه‌هایی از هر دو ژنوتیپ در هر دو استان حضور داشتند. تنوع موارد یافت شده‌ی جدایه‌ی VIId در استان خوزستان، بیشتر از استان اصفهان بود. جدایه‌های متعلق به ژنوتیپ II در این مطالعه، با سویه‌های پاکستانی، چینی و نیجریه‌ای شباهت داشتند و سایر جدایه‌ها نیز با سویه‌های ایرانی پیشین مشابه بودند.

کلمات کلیدی: بیماری نیوکاسل، علائم تنفسی، گله‌های گوشتی، آزمون RT-PCR، ژن F

Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 72-81

The role of Newcastle disease virus in respiratory syndromes of broiler flocks in Khuzestan and Isfahan provinces, Iran

By: Makki, F., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Boroomand, Z., (Corresponding Author) Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Mayahi, M., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Seyfi Abad Shapouri, M. R., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Received: 2021-02-28 **Accepted: 2021-04-25**

Emali: z.boroomand@scu.ac.ir

Newcastle disease, as one of the most important diseases of the poultry industry, has many economic losses. The aim of this study was to investigate the role of Newcastle disease virus in respiratory syndromes of broiler flocks in Khuzestan and Isfahan provinces. For this purpose, tissue samples (trachea, lung, and cecal tonsils) were taken from ten dead birds of 20 broiler farms with respiratory symptoms in different regions of these two provinces. Samples were inoculated into 9 to 11 days old embryonated chicken eggs. The RT-PCR was performed to detect Newcastle disease virus on allantoic fluid. Out of 20 studied flocks, the virus was isolated and identified in nine flocks. The 330 base pair nucleotide sequence in the F gene virus cleavage site was examined in 9 isolates. The results of RT-PCR test showed that Newcastle disease virus was isolated from respiratory syndromes in 50% of broiler flocks in Khuzestan province and 40% of broiler flocks in Isfahan province. Of the 9 isolates, 3 were in genotype II and 6 were in genotype VIId of class II Newcastle disease virus, and isolates of both genotypes were present in both provinces. The variety of VIId isolates found in Khuzestan province was more than Isfahan province. Isolates belonging to genotype II in this study were similar to Pakistani, Chinese and Nigerian strains, and other isolates were similar to previous Iranian strains.

Keywords: Newcastle disease, respiratory symptoms, broiler flocks, RT-PCR test, F gene

مقدمه

بیماری نیوکاسل (ND) یک بیماری مسری و شایع در گونه‌های اهلی و وحشی پرندگان است که به دلیل خسارت‌بار بودن برای صنعت طیور، در بسیاری کشورها (۲۵) از جمله ایران، قابل اهمیت می‌باشد. این بیماری با علائم تنفسی، عصبی و ضایعات خونریزی در دستگاه گوارش مشخص می‌شود (۲۵). عامل این بیماری یک ویروس با RNA تک‌رشته‌ای، سنس منفی، با مقدار تقریبی K ۱۵ جفت باز و دارای پوشش است که متعلق به خانواده پارامیکسوویریده بوده و در سروتیپ یک (APMV-۱) از جنس اورتوآوولاویروس قرار دارد (۴، ۲۵). ژنوم این ویروس متشکل از رمز ساخت شش پروتئین ساختاری شامل: نوکلئوکپسید (N)، فسفوپروتئین(P)، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، هماگلوتینین- نورآمینیداز (HN) و پلیمراز بزرگ (L) می‌باشد (۲۵). پاتوتیپ‌های ویروس بیماری نیوکاسل از حدت زیاد به کم عبارت از: حدت زیاد (ولوژنیک)، حدت متوسط (مزوژنیک)، حدت کم (لنتوژنیک) و روده‌ای بدون نشانه هستند (۲۵). جدایه‌های مختلف ویروس، مرتبط با ناحیه‌ی شکست پروتئین F۰ آن‌ها است. پروتئین F۰ در جدایه‌های کم حدت، فقط توسط پروتئازهای شبه تریپسین موجود در مجاری تنفسی و گوارشی در خارج از سلول به F۱ و F۲ شکسته می‌شوند؛ درحالی‌که در جدایه‌های حاد، پروتئین F۰ توسط پروتئازهای شبه فورین که در سلول‌های بیشتر بافت‌های میزبان موجود هستند، به F۱ و F۲ شکافته می‌شود. این تفاوت در فعال‌سازی پروتئازها، عامل اصلی مسبب تکثیر سیستمیک و بیماری شدید حاصل از ویروس حاد می‌باشند (۲۵). سویه‌های سروتیپ یک پارامیکسوویروس پرندگان، براساس آنالیز توالی ژن F به دو رده‌ی اصلی I و II تقسیم‌بندی می‌شوند. رده‌ی I، شامل ویروس‌های با حدت کم است که از پرندگان وحشی جداسازی می‌شوند و رده‌ی II، شامل ژنوتیپ‌های متعددی از ویروس‌های کم حدت و حاد بیماری نیوکاسل است که از پرندگان اهلی و وحشی جداسازی شده‌اند؛ هم‌چنین ویروس براساس تعیین سکانس نوکلئوتیدی ژن F به ژنوتیپ‌هایی تقسیم شده‌است که رده‌ی I شامل یک ژنوتیپ و رده‌ی II شامل ۱۸ ژنوتیپ (I-XVIII) می‌باشد (۴، ۱۷). در سال‌های اخیر موارد زیادی از وقوع بیماری نیوکاسل در گله‌های واکسینه با سطح پادتنی بالا گزارش شده‌است (۳)، و از طرف دیگر به این دلیل که شناسایی ویروس نیوکاسل در بسیاری از تحقیقات معتبر داخلی و خارجی بر مبنای پروتئین F۰ می‌باشد (۱۶)، لذا در مطالعه‌ی حاضر نقش ویروس بیماری نیوکاسل در بیماری‌های تنفسی گله های گوشتی استان‌های خوزستان و اصفهان بررسی شد و هم‌چنین توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ناحیه شکست ژن F در جدایه‌ها، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه

در دو استان خوزستان و اصفهان در فاصله زمانی بهار ۱۳۹۸ تا بهار ۱۳۹۹ از ۲۰ گله جوجه گوشتی مشکوک به بیماری نیوکاسل ۱۰قطعه پرنده تلف شده جداسازی و از هر پرنده سه نمونه بافتی (نای، ریه و لوزه‌های سکومی)نمونه‌گیری صورت گرفت و در مجموع ۶۰۰ نمونه‌ی بافتی تهیه شد(کاربرگ اطلاعات گله برای هر نمونه تکمیل و برنامه واکسیناسیون و سن گله ثبت شده‌است). رده سنی نمونه‌گیری برای گله‌های استان خوزستان ۴۲-۱۹ روزگی و برای گله‌های استان اصفهان ۴۲-۷ روزگی (جدول‌های یک و دو) بوده است. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای منفی ۷۰ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

جداسازی ویروس

نمونه‌های بافتی به‌صورت جداگانه خرد شده و در محلول بافر فسفاته (PBS) حاوی پنیسیلین ۱۰۰۰۰ IU/ml، استرپتومایسین ۱۰۰۰۰ µg/ml، جنتامایسین ۵ µg/ml، آمفوتریسین B ۵ µg/ml به‌صورت مخلوط همگن ۱۰٪ درآمده و مخلوط‌های همگن بافتی با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه سانترفیوژ شده و مواد رویی به عنوان مواد تلقیحی مورد استفاده قرار گرفت. میزان ml ۰/۲ از هر نمونه به‌درون حفره آلانتوئیک پنج تخم‌مرغ جنین‌دار نه روزه ماکیان تلقیح گردید. تخم‌مرغ‌ها برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شده و به منظور احتمال وجود آسیب‌های فیزیکی در زمان تلقیح، تخم‌مرغ‌هایی که تا ۲۴ ساعت اول بعد از تلقیح جنین آن‌ها تلف شده بود، حذف شدند. سپس مایع آلانتوئیک برداشت شد و پس از آزمون RT-PCR موارد منفی به صورت سریالی تا سه بار پاساژ داده شدند.

استخراج RNA

جهت استخراج RNA ویروس، µl ۲۰۰ از مایع آلانتوئیک به صورت جداگانه به ml ۱ محلول استخراج RNX- plus Solution (ساخت شرکت سیناژن، ایران) اضافه شد و استخراج طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. بر روی RNA استخراج شده، µl ۵۰ آب DEPC اضافه شد و تا زمان ساخت cDNA در فریزر منفی۷۰ سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

ساخت cDNA

برای ساختن cDNA از RNA استخراج شده از کیت cDNA Synthesis Kit (ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما، کشور ایران) استفاده گردید. برای این کار از زوج آغازگرهای شناساگر عمومی رندوم هگزامر و الیگو دی تی استفاده شد. cDNA ساخته شده در دمای منفی ۲۰ سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش PCR

میزان عوامل شرکت‌کننده در واکنش شامل: مستر میکس 2X با غلظت ۱/۵ mM MgCl 2، µl ۱۰ (آمپلیکون، کانادا)، آغازگرهای اختصاصی ژن F، (TT GAT GGC AGG CCT CTT GC) ndvf و (GG AGG ATG TTG GCA GCA TT) ndvr هر کدام ۱۰ pmol/ µl (۳)، DNA الگو µl ۳، آب µl ۶ در حجم نهایی µl ۲۰ و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و شرایط دمایی ۹۵ سانتی‌گراد، به مدت سه دقیقه واسرشت اولیه (Early Denaturation)، و ۴۰ سیکل شامل واسرشت (Denaturation) دردمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر (Annealing) در دمای ۵۵ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و امتداد (Extension) در دمای ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه تکرار شد و به دنبال آن نیز امتداد نهایی (Final Extension) در دمای ۷۲ ثانیه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل واکنش PCR یک نمونه کنترل منفی (آب DEPC به‌جای DNA الگو) و یک نمونه کنترل مثبت (RNA استخراج‌شده از واکسن‌های B1 و لاسوتا) قرار داده شد.

ارزیابی محصول PCR

محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪ رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن، به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ V ۱۰۰ الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی با رنگ ایمن در برابر نور UV تصویر برداری به عمل آمد. مارکر مورداستفاده DNA، ۱۰۰ bp (ساخت شرکت سیناژن، ایران) بود.

تعیین توالی محصول PCR

به میزان µl ۵۰ از محصول PCR نمونه‌های مثبت به همراه µl ۱۰ از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش به شرکت تکاپوزیست جهت خالص‌سازی و ارسال به شرکت کره‌ای BIONEER برای تعیین توالی فرستاده شد. توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن F جدایه‌های این مطالعه با یکدیگر و با جدایه‌های قبلی از ایران، کشورهای همسایه و سویه‌های مرجع NDV در مرکز ملی بیوتکنولوژی اطلاعات پایگاه داده (http://ncbi.nlm.nih.gov) با استفاده از nBLAST (http://) blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi و نرم‌افزار ClustalW2 مقایسه شد.

نتایج

از مجموع ۶۰۰ نمونه‌ی بافتی که به مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار تزریق شدند، ۱۱۴ مورد مثبت از نه گله در آزمون RT-PCR به‌دست آمد. در استان خوزستان ۷۴ مورد مثبت در پنج گله و در استان اصفهان ۴۰ مورد مثبت در چهار گله وجود داشت. در نهایت یک نمونه‌ی مثبت از هر گله جهت تعیین توالی ارسال شد. این توالی‌ها با توالی سایر جدایه‌های ویروس بیماری نیوکاسل شناسایی شده در ایران و جهان مقایسه شدند و درصد شباهت نوکلئوتیدی مشخص شد. نتایج نشان داد تعدادی از جدایه‌های بدست آمده از استان خوزستان و دو مورد از جدایه‌های حاصل از استان اصفهان، بیش از ۹۰٪ باهم شباهت داشتند و همگی در تحت ژنوتیپ VIId ویروس بیماری نیوکاسل قرارگرفتند؛ از طرف دیگر همین درصد تشابه بین یک جدایه از استان خوزستان و دو جدایه از استان اصفهان، که هر سه از اعضای ژنوتیپ II ویروس بیماری نیوکاسل بودند، مشاهده شد؛ اما مقایسه‌ی اعضای دو ژنوتیپ مذکور با هم، شباهت معناداری را نشان نداد. از طرفی جدایه‌های عضو تحت ژنوتیپ VIId این مطالعه به جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت را داشتند. بررسی توالی آمینواسیدی در ناحیه شکست پروتئین F۰ جدایه‌های مطالعه‌ی حاضر و مقایسه آن با شکل‌های یک

جدول ۱- اطلاعات و نتایج گله‌های گوشتی تحت مطالعه استان خوزستان.

شماره گله	سن گله در زمان نمونه گیری	Vitapest	Avinew	B۱	۳۰ Clone	Lasota	نای	ریه	لوزه‌های سکومی	کد نمونه	ژنوتیپ جداسازی شده
۱	۳۳	-	۲۳ روزگی آشامیدنی	۶ روزگی قطره چشمی	۱۲ و ۱۸ روزگی آشامیدنی	_	6/10	7/10	8/10	Nd1	VIId
۲	۳۵	-	۷ روزگی آشامیدنی	۱۲ و ۲۹ روزگی آشامیدنی	۱۸ روزگی آشامیدنی	_	4/10	-	-	Nd6	VIId
۳	۳۷	۱ روزگی آشامیدنی	-	۷ روزگی قطره چشمی	۱۲ روزگی آشامیدنی	۲۰ و ۲۷ روزگی آشامیدنی	9/10	8/10	۱۰/۵	Nd4	VIId
۴	۳۲	-	-	۱۰ روزگی آشامیدنی	۱۸ روزگی آشامیدنی	۲۵ روزگی آشامیدنی	-	-	-	_	-
۵	۱۹	-	-	۲ و ۸ روزگی آشامیدنی	۱۴ روزگی آشامیدنی	-	-	-	-	_	-
۶	۳۴	۲ روزگی اسپری	-	۷ روزگی قطره چشمی	۱۲ و ۱۸ و ۲۴ روزگی آشامیدنی	۳۰ روزگی آشامیدنی	-	-	-	_	-
۷	۴۲	-	۳ روزگی آشامیدنی	۳۲ روزگی آشامیدنی	۱۰ و ۱۷ و ۲۵ روزگی آشامیدنی	-	-	-	-	_	-
۸	۲۹	-	۳ روزگی آشامیدنی	۹ روزگی آشامیدنی	۱۷ روزگی آشامیدنی	-	9/10	8/10	۱۰/۳	Nd8	VIId
۹	۲۰	-	-	-	۱۰ روزگی آشامیدنی	۱۹ روزگی آشامیدنی	5/10	-	۱۰/۲	Nd14	II
۱۰	۳۷	۱ روزگی اسپری	-	۷ و ۲۳ روزگی آشامیدنی	۱۲ و ۱۸ و ۳۰ روزگی آشامیدنی	-	-	-	-	_	_

جدول ۲- اطلاعات گله‌های گوشتی و نتایج تحت مطالعه استان اصفهان.

شماره گله	سن گله در زمان نمونه گیری	Vitapest	Avinew	B۱	۳۰ Clone	Lasota	نای	ریه	لوزه‌های سکومی	کد نمونه	ژنوتیپ جداسازی شده
۱	۴۲	۱ روزگی اسپری	-	۷ روزگی قطره چشمی	۱۲ و ۲۸ روزگی آشامیدنی	۱۸ و ۳۶ روزگی آشامیدنی	-	-	-	-	-
۲	۷	۱ روزگی اسپری	-	۶ روزگی قطره چشمی	-	_	5/10	-	-	Nd12	II
۳	۱۷	-	-	۷ روزگی قطره چشمی	-	_	-	-	-	-	-
۴	۳۹	-	-	۸ روزگی قطره چشمی	۱۴ و ۲۲ روزگی آشامیدنی	-	6/10	3/10	5/10	Nd5	VIId
۵	۲۵	۱ روزگی اسپری	-	-	۱۲ و ۲۰ روزگی آشامیدنی	-	-	-	-	-	-
۶	۱۷	-	-	۶ روزگی قطره چشمی	۱۲ روزگی آشامیدنی	-	-	-	-	-	-
۷	۲۴	-	۷ روزگی آشامیدنی	۲ و ۱۲ روزگی آشامیدنی	۱۹ روزگی آشامیدنی	-	-	-	-	-	-
۸	۳۲	-	۳ روزگی آشامیدنی	۸ روزگی قطره چشمی	۱۷ روزگی آشامیدنی	-	7/10	5/10	4/10	Nd3	VIId
۹	۱۸	۲ روزگی اسپری	-	۹ روزگی قطره چشمی	۱۴ روزگی آشامیدنی	-	-	-	-	-	-
۱۰	۹	-	-	۷ روزگی قطره چشمی	-	-	5/10	-	-	Nd9	II

و دو، نشان داد جدایه‌های مربوط به تحت ژنوتیپ VIId بدست آمده از استان خوزستان همگی به سویه‌های با حدت بالا شامل Essex70، Beaudette ،Kvuzat-Yavne/50-826، Niger/1377-7/06، NA-1 CN/ZJ-1/00، US(CA)/1083Fontana/72 و AF2240 تشابه داشتند. همین بررسی در رابطه با جدایه‌های تحت ژنوتیپ VIId حاصل از استان اصفهان، حاکی از پیروی هر دو جدایه از الگوی آمینواسیدی ویروس‌های حدت بالای نیوکاسل در ناحیه شکست پروتئین F۰ بود. در ضمن توالی آمینواسیدی ناحیه‌ی مذکور در تمامی جدایه‌های ژنوتیپ II این مطالعه، با سویه‌های حدت پایین ویروس بیماری نیوکاسل شامل Lasota/46، DE-R49 99 و B1/46 مشابه بود.

بحث

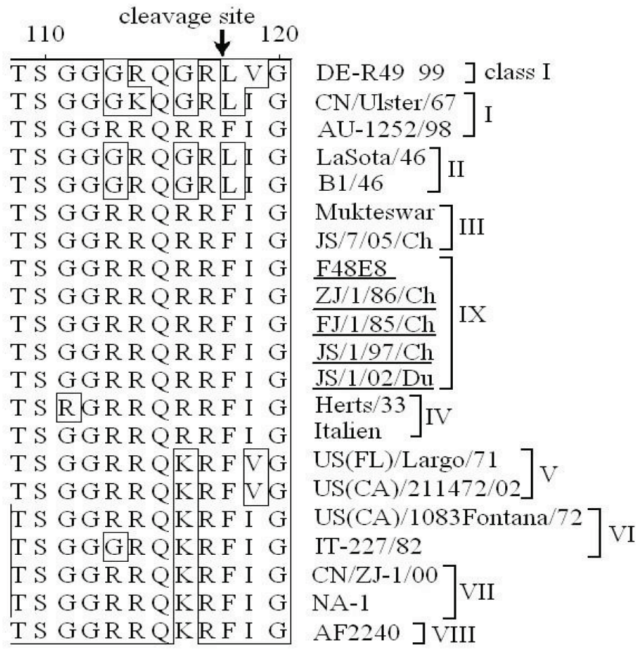
اهمیت بیماری نیوکاسل چنان است که حتی کشورهای دارای صنعت طیور پیشرفته نیز به جهت پیشگیری و کنترل این بیماری و خسارت‌های اقتصادی ناشی از آن و یا دست‌یابی به شرایط عاری از بیماری پس از بروز واگیری‌ها، هزینه‌های گزافی را صرف می‌کنند (۱۳). هم‌چنین در بسیاری از کشورهای درحال توسعه ویروس بیماری نیوکاسل به صورت اندمیک حضور دارد و لذا به عنوان یک عامل محدودکننده‌ی مهم در توسعه‌ی صنعت طیور این کشورها لحاظ می‌شود (۲۵). نتایج این مطالعه حاکی از جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل در نه گله از ۲۰ گله‌ی گوشتی (۴۵٪) مورد مطالعه در استان‌های خوزستان و اصفهان بود. از هر یک از نه گله‌ی مثبت شده، یک نمونه مورد تعیین توالی قرارگرفت که نتایج حاکی از قرارگیری شش جدایه در تحت ژنوتیپ VIId و سه جدایه در ژنوتیپ II از کلاس II ویروس بیماری نیوکاسل بود. هم‌چنین تحت ژنوتیپ غالب در این بررسی VIId بود که به ترتیب از ارگان‌های نای، ریه و لوزه‌های سکومی بیشترین میزان جداسازی را داشته است. در ضمن میزان جداسازی تحت ژنوتیپ VIId در استان خوزستان، بیشتر از استان اصفهان بود. ژنوتیپ VII یک گروه بزرگ (از کلاس II ویروس بیماری نیوکاسل) با تنوع ژنتیکی بالا می‌باشد که اولین گزارش‌های آن مربوط به اواخر دهه‌ی ۸۰ و اوایل دهه‌ی ۹۰ میلادی است. ویروس‌های متعلق به این ژنوتیپ ابتدا در خاور دور (مناطق شرقی آسیا) پدیدار شدند و سپس به اروپا، آفریقای جنوبی و آمریکای جنوبی گسترش یافتند. بر اساس توالی آمینواسیدی چنین پیش‌بینی شده است که همه‌ی ویروس‌های این ژنوتیپ از حدت بالایی برخوردارند و تعداد زیادی از آن‌ها جزو ویروس‌های ولوژنیک بیماری نیوکاسل بوده و با شیوع ناگهانی این بیماری در اروپای شرقی، خاورمیانه و آسیا و نیز وقوع پراکنده‌ی این بیماری در آفریقا و آمریکای جنوبی مرتبط هستند (۵، ۱۷). تحت ژنوتیپ VIId نیز به سرعت از نقاط مختلف جهان جدا شده و به عنوان یکی از بیشترین تحت ژنوتیپ‌های غالب در گردش تا اوایل قرن ۲۱ شناخته شد. ویروس‌های متعلق به این تحت ژنوتیپ از پرندگان در چین (۱۹۹۸-۲۰۱۳)، کره جنوبی (۲۰۰۰-۲۰۰۵) و کلمبیا (۲۰۰۶-۲۰۱۰) جداسازی شده‌اند. به علاوه گزارش‌های پراکنده‌ای از وجود تحت ژنوتیپ VIId در پرندگان برخی کشورها از جمله آفریقای جنوبی، اوکراین و ونزوئلا طی سال‌های ۲۰۰۹-۲۰۰۴ وجود دارد. هم‌چنین جداسازی ویروس‌های این تحت ژنوتیپ از پرندگان وحشی با نشانه‌های درمانگاهی بیماری از جمله لک‌لک گرمسیری کاکلدار (crested ibis Nipponia nippon)، در چین و مناطق مختلفی از صربستان طی سال‌های ۲۰۰۷-۲۰۰۶، بیانگر ظرفیت گسترش و چرخش بالای این ویروس‌ها در جهان و هم‌چنین پتانسیل انتقال آن‌ها بین پرندگان اهلی و وحشی می‌باشد (۵). ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۲)، با آنالیز فیلوژنتیکی ژن F، ۵۱ جدایه ویروس بیماری نیوکاسل از ماکیان در آسیا طی سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۱۱، نشان دادند که ژنوتیپ VII هنوز در میان پرندگان اهلی قاره آسیا غالب بوده و تحت ژنوتیپ VIId در ایران

Virus strain	Virulence[a]	ICPI	Cleavage site AA 111-118[b]	Reference
Herts33	High	1.88	G-R-R-Q-R-R↓F-I	(282)
Essex '70	High	1.86	G-R-R-Q-K-R↓F-V	(59)
135/93	High	1.30	V-R-R-K-K-R↓F-I	(203)
617/83	High	1.46	G-G-R-Q-K-R↓F-I	(58)
34/90	High	1.81	G-K-R-Q-K-R↓F-I	(59)
Beaudette	High	1.46	G-R-R-Q-K-R↓F-I	(59)
Karachi/SPV/33	High	1.85	G-R-R-Q-R-R↓F-I	(214)
Kvuzat-Yavne/50-826	High	1.89	G-R-R-Q-K-R↓F-I	(214)
Australian isolates				
Peats Ridge	Low	0.41	G-R-R-Q-G-R↓L-I	(303)
QV4	Low	0.39	G-K-R-Q-G-R↓L-I	(255, 303)
Somersby 98	Low	0.51	G-R-R-Q-R-R↓L-I	(138, 303)
Dean Park	High	1.60–1.70	G-R-R-Q-R-R↓F-I	(303)
PR-32	Low	0.64	G-K-R-Q-G-R↓F-I	(138, 303)
African isolates				
Chicken/MG/'92	High	—[c]	G-R-R-R-R-R↓F-V	(257)
Niger/1377-7/06	High	1.84	G-R-R-Q-K-R↓F-I	(50, 271)
Nigeria/228-7/06	High	1.90	G-R-R-Q-R-R↓F-I	(271)
Chicken/Mali/'07	High	—[c]	G-R-R-R-K-R↓F-V	(257)
Burkina Faso/2415-580/08	High	1.69	G-R-R-R-K-R↓F-I	(50)
South Africa/08100426/08	High	1.91	G-R-R-R-K-R↓F-I	(271)

[a] Virulence for chickens.
[b] ↓ = cleavage point. Basic amino acids in bold. Note that all virulent viruses have phenylalanine (F) at position 117 (the F1 N terminus).
[c] Unknown ICPI.

شکل ۱- توالی آمینواسیدی ناحیه شکست پروتئین F۰ در مطالعه برخی جدایه‌های پیشین (۲۵).

و کشورهای شبه قاره هند در گردش است و این در حالی‌ست که تحت ژنوتیپ VIId در کشورهای خاور دور وجود داشت (۶). رستمعلی و همکاران (۱۳۹۲)، در بررسی فیلوژنتیکی ژن F ویروس بیماری نیوکاسل در همه‌گیری شدید این بیماری طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ در ایران، بیان نمودند که جدایه‌های مطالعه ایشان که در تحت ژنوتیپ VIId از کلاس II قرار داشتند، از نظر فیلوژنتیکی با جدایه‌های یافت شده در ایران در مطالعات قبلی (تحت ژنوتیپ VIId) متفاوت بوده اما با جدایه‌های به‌دست آمده از کشورهای چین و فلسطین مشابه بودند. در واقع در برخی موارد چنین تفاوت‌هایی در ناحیه شکست ژن F، در حدت ویروس تأثیری ندارد اما می‌تواند ناشی از موتاسیون و یا ورود ویروس از کشورهای دیگر باشد (۲۲). پس از آن قلیانچی و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه فیلوژنتیکی براساس ژن فسفوپروتئین ویروس‌های ایرانی نیوکاسل جدا شده طی سال‌های ۲۰۱۲-۲۰۱۰ اذعان داشتند شش جدایه ویروس بیماری نیوکاسل (تأیید شده با آنالیز سکانس ژن F) که از شیوع ناگهانی این بیماری در فارم‌های گوشتی، مادر و شترمرغ استان‌های گیلان، مازندران، البرز، اصفهان و تهران جداسازی شده بودند در ژنوتیپ VII قرار دارند. نتایج مطالعه ایشان اولین گزارش وجود تحت ژنوتیپ VIId در ایران بود (۹). مطالعات پیوسته در زمینه مولکولی و اپیدمیولوژی ویروس بیماری نیوکاسل طی سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۱۶ در ایران توسط میاحی و اسمائیلی‌زاد، نشان داد تحت ژنوتیپ‌های XIIId، VIId، VIIj، VIj، VIg، XIIIa، در این بازه زمانی ۲۱ ساله در میان طیور تجاری ایران در گردش بوده‌اند (۱۴). بررسی توالی آمینواسیدی ناحیه شکست پروتئین F۰ در جدایه‌های مطالعه حاضر، توالی ۱۱۲RRQKR/F۱۱۷ را برای جدایه‌های تحت ژنوتیپ VIId در استان خوزستان، و توالی ۱۱۲RKQKR/F۱۱۷ را برای جدایه‌های این تحت ژنوتیپ در استان اصفهان نشان داد. هم‌چنین حضور اسیدآمینه‌ی فنیل آلانین در جایگاه ۱۱۷ پروتئین F۰ همه‌ی جدایه‌های تحت ژنوتیپ VIId این مطالعه مشهود است. از طرفی توالی آمینواسیدی ناحیه شکست پروتئین F۰ در هر سه جدایه‌ی مربوط به ژنوتیپ II این مطالعه، همگی مشابه هم و به صورت ۱۱۲GRQGR/L۱۱۷بودند. در این سه جدایه اسیدآمینه‌ی لوسین در جایگاه ۱۱۷ پروتئین F۰ قرار گرفته‌است. به طور کلی برای ورود ویروس بیماری نیوکاسل به سلول میزبان باید گلیکوپروتئین پیش‌ساز F۰ به F۱ و F۲ شکسته شود و تنها غشای ویروس‌هایی که F۰ آن‌ها شکافته شده است، توانایی امتزاج با سلول میزبان را دارند (۲۵). عموماً شکافت توسط پروتئازهای غیرویروسی انجام می‌گیرد و توانایی پروتئاز جهت شکافت F۰، به توالی اسیدهای آمینه در اطراف محل شکافت بستگی دارد. این توالی در ویروس‌های لنتوژن به این صورت است که در انتهای کربوکسی پروتئین F۲، یک اسیدآمینه‌ی بازی و در انتهای آمینی پروتئین F۱، اسیدآمینه‌ی لوسین قرارگرفته‌است (۱۱۲G-R/K-Q-G-R↓L۱۱۷) (۲۵). سویه‌های ولوژن ویروس در انتهای کربوکسی پروتئین F۲ دارای توالی چند اسیدآمینه‌ی بازی (حضور حداقل سه اسیدآمینه‌ی بازی) و در انتهای آمینی پروتئین F۱، دارای اسیدآمینه‌ی فنیل آلانین هستند (۱۱۲R/G/K-R-Q/K-K/R-R↓F۱۱۷) (۲۵). در ادامه به مقایسه‌ی توالی‌های یافت شده در پژوهش حاضر با دیگر مطالعات در این زمینه، می‌پردازیم. کیانی‌زاده و همکاران (۲۰۰۲)، با بررسی نه جدایه از ویروس بیماری نیوکاسل بدست آمده از مناطق مختلف ایران (۱۲)؛ فتحی و همکاران (۲۰۰۸)، با مطالعه‌ی جدایه‌های ویروسی بیماری نیوکاسل در مزارع گوشتی و تخم‌گذار تجاری و بومی (۷) و صمدی و همکاران (۲۰۱۴)، با مطالعه‌ی مولکولی و فیلوژنتیکی شش جدایه‌ی ولوژنیک ویروس بیماری نیوکاسل جداشده از شش منطقه‌ی جغرافیایی متفاوت در ایران که در ژنوتیپ VII قرارگرفتند (۲۳)، همگی الگوی آمینواسیدی ۱۱۲RRQRR/F۱۱۷ را برای ناحیه شکست پروتئین F۰ جدایه‌های مورد مطالعه‌ی خود ارائه نمودند. طبق گزارش مونیر و همکاران (۲۰۱۲) از پاکستان، همه‌ی جدایه‌های ولوژنیک بررسی شده توسط ایشان، الگوی آمینواسیدی ۱۱۲RRQKR/F۱۱۷ را در ناحیه شکست پروتئین F۰ نشان دادند (۱۹). همچنین توالی یابی جدایه‌های ویروسی بیماری نیوکاسل در مطالعه‌ی رستمعلی و همکاران (۱۳۹۲) در ایران، بیانگر الگویی مشابه با یافته‌ی فوق بود (۲۲). مهربان‌پور و همکاران (۲۰۱۴)، در بررسی مولکولی ویروس بیماری نیوکاسل در سطح مزارع استان فارس بیان کردند که شش جدایه از ویروس دارای الگوی ۱۱۲RRQKR/F۱۱۷ در محل شکست پروتئین F۰ بودند و در گروه جدایه‌های ولوژنیک قرار گرفتند و چهار جدایه با داشتن الگوی ۱۱۲GRQGR/L۱۱۷ در ناحیه‌ی مذکور، در گروه لنتوژنیک‌ها قرار گرفتند. ۱۰ جدایه‌ی مورد مطالعه‌ی آن‌ها همگی در ژنوتیپ III از کلاس II ویروس بیماری نیوکاسل قرار داشتند. لازم به ذکر است که توالی آمینواسیدی مذکور برای جدایه‌های لنتوژن، مشابه با توالی جدایه‌های کم حدت مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (۱۶). بررسی توالی آمینواسیدی ناحیه شکست پروتئین F۰ جدایه‌های حدت بالای ویروس بیماری نیوکاسل (اعضای تحت ژنوتیپ VIIb) در



شکل ۲- توالی آمینواسیدی ناحیه شکست پروتئین F۰ در مطالعه برخی جدایه‌های پیشین (۲۰).

بررسی احمدی و همکاران (۲۰۱۶) (۱) و جدایه‌های ولوژنیک حاصل از مطالعه برومند و همکاران (۲۰۱۶)، در اهواز نیز همگی از الگوی ۱۱۲RRQKR/F۱۱۷ پیروی می‌کردند (۳). قلیانچی و همکاران (۲۰۱۸)، نشان دادند تحت ژنوتیپ حاد و نوظهور VIIiنیز از الگوی ۱۱۲RRQKR/ F۱۱۷ در ناحیه‌ی مذکور پیروی می‌نماید (۸). توالی‌یابی جدایه‌ها در مطالعه جباری‌فخار و همکاران (۲۰۱۸) هم بیانگر پیروی این جدایه‌های ولوژنیک از الگوی آمینواسیدی ۱۱۲RRQKR/F۱۱۷ در ناحیه شکست پروتئین F۰ بود (۱۱). در این مطالعه، بیشترین جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل متعلق به استان خوزستان بود. به طوری‌که از ۱۰ گله مورد مطالعه، در پنج گله (۵۰٪) موارد مثبت ثبت شد که جدایه‌های حاصل از چهار گله در تحت ژنوتیپ VIId کلاس II و یک گله مربوط به ژنوتیپ II از کلاس II بودند. طبق بررسی نتایج، جدایه‌های این استان از حدت بالایی برخوردار بوده، و با جدایه‌های ایرانی (تحت ژنوتیپ VIId) موجود در بانک ژن شباهت زیادی نشان دادند؛ اما یک جدایه حدت پایینی داشته (ژنوتیپ II) و به سویه‌های لاسوتا، B۱ و نیز سویه‌های پاکستانی، نیجریه‌ای و چینی تشابه نشان داد. باتوجه به تاریخچه‌ی گله‌ی مورد نظر که دو واکسن آشامیدنی شامل clone ۳۰ در ۱۰ روزگی و لاسوتا در ۱۹ روزگی را دریافت نموده و در ۲۰ روزگی نمونه‌گیری صورت گرفته است، لذا احتمال دارد جدایه‌ی مذکور همان سویه واکسن باشد. مطالعات پیشین در این استان نیز مؤیّد حضور جدایه‌های مختلف با حدت‌های متفاوت می‌باشند. میاحی و همکاران (۱۳۹۴)، به جداسازی و شناسایی عامل بیماری نیوکاسل از مزارع پرورش ماکیان گوشتی استان خوزستان مبادرت نمودند. در همین راستا از ۳۰ مزرعه پرورش جوجه گوشتی استان نمونه‌گیری به عمل آمد و پس از انجام آزمون RT-PCR، شش جدایه ویروس بیماری نیوکاسل جداسازی گردید. هر شش جدایه مذکور علاوه بر جداسازی از سایر بافت‌ها، از بافت مغز نیز جداسازی شدند و نظر به این‌که واکسن‌های نیوکاسل موجود در ایران از سویه‌های لنتوژن می‌باشند، جدایه‌های یاد شده مربوط به ویروس واکسن نبودند (۱۵). برومند و همکاران (۲۰۱۶)، با تعیین هویت مولکولی و مطالعه فیلوژنیک ژن F ویروس بیماری نیوکاسل در شیوع این بیماری در اهواز نشان دادند سه جدایه ویروسی حاصل از نمونه‌گیری آن‌ها از گله‌های گوشتی تجاری و واکسینه با مرگ و میر بالا و علائم تنفسی، در کلاس II و تحت ژنوتیپ VIId این ویروس قرار می-گیرند (۳). در استان اصفهان از ۱۰ گله مورد مطالعه ما، چهار گله (۴۰٪) به لحاظ حضور ویروس نیوکاسل مثبت اعلام شد که جدایه‌های حاصل از دو گله در ژنوتیپ II از کلاس II قرار گرفتند و به سویه‌ی B۱ ویروس بیماری نیوکاسل شباهت داشتند؛ نظر به این‌که هر دو گله به‌ترتیب در سن شش و هفت روزگی واکسن B۱ (قطره چشمی) را دریافت نموده‌اند، احتمال دارد که جدایه‌های مذکور مربوط به سویه‌ی واکسینال باشند. دو جدایه‌ی دیگر یافت شده در این استان که حدت بالایی داشتند، به لحاظ درصد تشابه بسیار به هم نزدیک بودند (۹۸/۶۳ ٪) و هر دو در تحت ژنوتیپ VIId از کلاس II ویروس قرار گرفتند و هر دو با جدایه‌های ایرانی ویروس نیوکاسل نیز شباهت نشان دادند. رحیمیان و همکاران (۱۳۹۰)، با شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی ویروس بیماری نیوکاسل در طیور گوشتی اصفهان، به تعیین شباهت ژنتیکی ژن F این ویروس در ایران و مقایسه آن با سایر کشورها پرداختند. مقایسه ردیف نوکلئوتیدی تعیین شده در مطالعه‌ی آن‌ها با سکانس شناخته شده ژن F در سایر کشورها بیانگر وجود درصدی (۲۷/۳ - ۱/۴ ٪) از تنوع ژنتیکی بود که در این میان بیشترین قرابت با ردیف نوکلئوتیدی ژن F در هند و بیشترین تفاوت با ردیف نوکلئوتیدی شناخته شده‌ی این ژن در ایالات متحده مشاهده گردید (۲۱). بررسی شعبانی و همکاران (۱۳۹۶)، با هدف شناسایی ویروس بیماری نیوکاسل و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) در تلفات حاد شترمرغ‌ها در استان اصفهان صورت گرفت. ۴۰ نمونه نای از ۲۲ گله شترمرغ واجد تلفات از نقاط مختلف این استان جمع‌آوری شد و بررسی حضور ویروس بیماری نیوکاسل با آغازگرهای اختصاصی ژن M صورت گرفت. از مجموع ۲۲ گله مورد بررسی، ۱۵ گله (۶۸٪۱۸) به این ویروس آلوده بودند. آن‌ها اعلام نمودند آلودگی با ORT در این گله‌های منتفی بوده اما ویروس بیماری نیوکاسل سهم بالایی در ایجاد تلفات حاد در گله‌های مذکور داشته است (۲۴). نتایج پژوهش عالیان سماک‌خواه و همکاران (۱۳۹۸)، در ارتباط با رخداد بیماری نیوکاسل در مزارع طیور گوشتی کشور طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ نشان داد، سویه‌های حاد (ولوژن) ویروس بیماری نیوکاسل در مرغداری‌های صنعتی گوشتی ایران در گردش بوده و از وقوع بالایی برخوردار است. در این بررسی از ۱۸۵ واحد، تعداد ۱۱۵ مزرعه (۶۲/۱۶ ٪) از نظر این ویروس در آزمون HI مثبت شدند. در مرحله‌ی بعد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در آزمون RT-PCR، از ۶۹ مزرعه (۳۷/۳ ٪) پاتوتیپ واکسینال (غیرحاد) و از ۴۶ مزرعه (۲۵٪) پاتوتیپ حاد (ویروس فیلد) ردیابی شد. در ضمن بیشترین درصد مزارع مبتلا به بیماری نیوکاسل به ترتیب مربوط به استان‌های مازندران (۳۷٪) و اصفهان (۲۲٪) بود (۲). حاجی‌عبدالوهاب و همکاران (۲۰۱۹)، شیوع ویروس‌های آنفولانزا، نیوکاسل و برونشیت عفونی را در گله‌های گوشتی مبتلا به سندرم کمپلکس تنفسی طی سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۱۵، در ایران مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج از ۸۵ گله مثبت به لحاظ حضور ویروس بیماری نیوکاسل، ۶۳ مورد ولوژنیک گزارش شد. آمار گله‌های مبتلا در استان‌های مشابه با مطالعه حاضر به این شرح می‌باشد: استان خوزستان ۳ مورد از ۹ گله و استان اصفهان ۵ مورد از ۲۲ گله (۱۰). درنهایت باتوجه به نتایج مطالعه حاضر و سایر پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه و امکان بروز تغییر در ژنوم ویروس بیماری نیوکاسل و ظهور جدایه‌های جدید، پایش دوره‌ای برای آگاهی از این جدایه‌ها و میزان شیوع آن‌ها حائز اهمیت است. به‌طور کلی بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌ها می‌تواند در ارزیابی وضعیت ویروس بیماری نیوکاسل و پیشرفت در طراحی برنامه‌های واکسیناسیون بنابر ضرورت‌های منطقه‌ای کارساز واقع شود. مقایسه‌ی توالی اسید نوکلئوتیدی برخی جدایه‌های مورد مطالعه با واکسن‌های شایع در صنعت طیور شامل B۱ و Lasota تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. واکسن‌های فوق در ژنوتیپ II از کلاس II قرار دارند و از نظر ژنتیکی فاصله‌ی زیادی را با این جدایه‌ها نشان می‌دهند. درک این موضوع ممکن است نیاز به تولید واکسن‌هایی که دارای قرابت ژنتیکی بیشتری با ویروس‌های فیلدی باشند را ترغیب نماید (۱۸).

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر نشان داد در هر ۲ استان مورد مطالعه، جدایه‌های ویروس بیماری نیوکاسل از هر دو ژنوتیپ II و VII حضور دارند؛ گرچه در هر ۲ استان هیچ ۲ جدایه‌ای به طور کامل شبیه به هم و مشترک نبوده‌اند امّا جدایه‌های مرتبط با هرکدام از ژنوتیپ‌ها با یکدیگر درصد بالایی از تشابه را نشان دادند. در این میان استان خوزستان تنوع بیشتری از جدایه‌ها (به‌خصوص در تحت ژنوتیپ VIId) را در مقایسه با استان اصفهان نشان داد. این پژوهش در بررسی جدایه‌های ویروس بیماری نیوکاسل و پایش ظهور جدایه‌های ویروسی جدید کمک‌کننده بوده و می‌تواند در جهت بهبود برنامه‌های واکسیناسیون و نوع واکسن‌های مورد استفاده در گله‌های گوشتی به گونه‌ای کارآمدتر، مفید واقع شود.

منابع مورد استفاده

1.Ahmadi, E., S. A. Pourbakhsh, M. Ahmadi, K. Mardani and A. Talebi.2016. Phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus isolated during outbreaks in northwestern Iran in 2010. *Archives of Virology* 161 (11): 3151-60.

2.Alian Samakkhah, Sh., A. Bahonar, F. Zaynolabedini Tehrani, S. A. Ghafouri, A. Sadrzadeh and M. H. Fallah Mehrabadi.2019. Occurrence of Newcastle Disease in Iranian broiler farms during 2013-2015. *Journal of Veterinary Research* 74 (1): 1-10.

3.Boroomand, Z., R. A. Jafari and M. Mayahi.2016. Molecular characterization and phylogenetic study of the fusion genes of Newcastle disease virus from the recent outbreaks in Ahvaz, Iran. Virus Disease,*Indian Journal of Virology* 27 (1): 102-105.

4.Dimitrov, K. M., G. Abolnik, G. L. Afonso, E. Albina, J. Bahl, M. Berg, F. X. Briand, I. H. Brown, K. S. Choi, I. Ghvala, D. G. Diel, A. P. Durr, H. L. Ferreira, A. Fusaro, P. Gil, G. V. Goujgoulova, C. Grund, J. T. Hicks, T. M. Joannis, M. K. Torchetti, S. Kolosov, B. Lambrecht, N. S. Lewis, H. Liu, H. Liu, S. McCullough, P. J. Miller, I. Monne, C. P. Muller, M. Munir, D. Reischak, M. Sabra, S. K. Samal, R. S. Almeida, I. Shittu, C. J. Snoeck, D. L. Suarez, S. V. Borm, Z. Wang and F. Y. K.Wong.2019. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution* 74, Article 103917.

5.Dimitrov, K. M., A. M. Ramey, X. Qui, J. Bahl and C. L. Afonso.2016. Temporal, geographic and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infection,Genetics and Evalution* 39: 22-34.

6.Ebrahimi, M. M., S. Shahsavandi, G. Moazenijula and M. Shamsara.2012. Phylogeny and evolution of Newcastle disease virus genotypes isolated in Asia during 2008-2011. *Virus Genes* 45 (1): 63-68.

7.Fathi, E., S. A. Pourbakhsh and M. Jafarian.2008. Phylogenetic analysis and characterization of Newcastle disease virus by molecular methods in Chaharmahal-e-Bakhtiari province, Iran. *Vet Journal* 5 (2): 50-55.

8.Ghalyanchilangeroudi, A., H. Hosseini, M. Jabbarifakhr, M. H. Fallah Mehrabadi, H. Najafi, S. A. Ghafouri, F. S. Mousavi, Z. Ziafati and A. Modiri.2018. Emergence of a virulent genotype VIIi of Newcastle disease virus in Iran. *Avian Pathology* 47 (5): 509-519.

9.Ghalyanchi Langroudi, A., H. Hosseini, V. Karimi, O. Madadgar, M. Hashemzadeh, SA. Ghafouri, SS. Bagheri Ghadikolaei and SM. Vahedi.2014. Phlogenetic study based on the phosphoprotein gene of Iranian Newcastel disease viruses (NDV) isolates, 2010-2012. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 8 (2): 73-77.

10.Haji-Abdolvahab, H., A. Ghalyanchilangeroudi, A. Bahonar, S. A. Ghafouri, M. Vasfi Marandi, M. H. Fallah Mehrabadi and F. Tehrani.2019. Prevalence of avian influenza, Newcastle disease, and infectious bronchitis viruses in broiler flocks infected with multifactorial respiratory disease in Iran, 2015-2016. *Tropical Animal Health and Production* 51: 689-695.

11.Jabbarifakhar, M., F. S. Mousavi, H. Rezaee, M. H. Fallah, R. Esmaeelzade Dizaji and A. Ghalyanchilangeroudi.2018. Emergence of genotype VIIg of velogenic Newcastle disease virus in Iran, 2018: The first report. *Iranian Journal of Virology* 12 (1): 40-46.

12.Kianizadeh, M., I. Aini, A. R. Omar, K. Yusoff, M. Sahrabadi and R. Kargar.2002. Sequence and phylogenetic analysis of the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus field isolates from Iran. *Acta Virologica* 46: 247-51.

13.Leslie, J.2000. Newcastie disease: Outbreak losses and control policy costs. *The Veterinary record* 146: 603-606.

14.Mayahi, V and M. Esmaelizad.2017. Molecular evolution and epidemiological links study of Newcastle disease virus isolates from 1995 to 2016 in Iran. *Archives of Virology* 162 (12): 3727-3743.

15.Mayahi M., M. R. Seyfi Abad Shapouri, R. A. Jafari and B. Mohammadian Ghaleh Joughi.2015. Isolation and identificetion of Newcastle disease agent from broiler farms in Khuzestan province. *Journal of Veterinary Microbiology* 11:101-108.

16.Mehrabanpour, M. J., S. Khoobyar, A. Rahimian, M. B. Nazari and M. R. Keshtkar.2014. Phylogenetic characterization of the fusion genes of the Newcastle disease viruses isolated in Fars province poultry farms during 2009-2011. *Veterinary Research Forum* 5 (3): 187-91.

17.Miller, P. J., R. Haddas, L. Simanov, A. Lublin, S. F. Rehmani, A. Wajid, T. Bibi, T. A. Khan, T. Yaqub, S. Setiyaninqsih and C. L. Afonso.2015. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features. *Genetics and Evolution* 29: 216-229.

18.Miller, P. J., D. J. King, C. L. Afonso and D. L. Suarez.2007. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after avirulent challenge. *Vaccine* 25 (41): 7238- 7246.

19.Munir, M., M. Cortey, M. Abbas, Z. U. Qureshi, F. Afzal, M. Z. Shabbir, M. T. Khan, S. Ahmed, S. Ahmad, C. Baule, K. Stahl, S. Zohari and M. Berg.2012. Biological characterization and phylogenetic analysis of a novel genetic group of Newcastel disease virus isolated from outbreaks in commercial poultry and from backyard poultry flocks in Pakistan. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2 (5): 1010-101.

20.Qiu, X., Q. Sun, S. Wu, L. Dong, S. Hu, C. Meng, Y. Wu and Lui, X.2011. Entire genome sequence analysis of genotype IX Newcastle disease viruses reveals their early-genotype phylogenetic position and recent-genotype genome size. *Virology Journal* 8: Article 117.

21.Rahimian, M. D., A. Zamani Moghaddam, H. Momtaz and M. H. Niazi.2011. Detection and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus based on molecular techniques in broiler in Isfahan province. *Journal of Veterinary Microbiology* 7:25-36.

22.Rostamali, T., A. H. Shooshtari, S. Charkhkar and M. H. Bozorgmehri Fard.2014. Phylogenetic analysis of F gene of Newcastle virus isolated in Iran during 2010 and 2011. *Journal of Comparative Pathobiology* 10:1065-1070.

23.Samadi, S., M. Kianizadeh, M. F. Najafi, S. D. M. Nasab, A. M. H. Davatgar, A. Royaee and P. Pilvar.2014. Molecular characterization and phylogenetic study of velogenic Newcastle disease virus isolates in Iran. *Virus genes* 48 (2): 290-295.

24.Shabani, A. A., M. Gholami Ahangaran and H. Momtaz.2017. Molecular detection of Ornithobacterium rhinotracheale and Newcastle disease virus in ostriches of Isfshsn province. *Journal of Veterinary Clinical Pathology* 11 (2): 97-105.

25.Suarez, D. L., P. J. Miller, G. Koch, E. Mundt and S. Rautenschlein.2019. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus *Infections*.PP.111-166.In: D. E. Swayne, M. Boulianne, C. M. Logue, L. R. McDougald, V. Nair, D. J. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T. Y. Prajitno, L. Rubinoff and G. Zavala (eds.). Diseases of Poultry, 14th edn. Wiley Blackwell, New York.