DOI: 10.22092/vj.2020.124906.1551
شماره ۱۳۱ تابستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

جداسازی، شناسایی و آنالیز فیلوژنی برمبنای ژن F ویروس بیماری نیوکاسل جدا شده از مرغداری های گوشتی استان مرکزی

• **مهدی احمدی (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران
•**محمد مجید ابراهیمی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرج، ایران
• **شهلا شاهسوندی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرج، ایران
• **سعیده ابراهیمی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران
• **عادل حمیدی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران
• **شمس الدین قائم مقامی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۱۰-۲۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹-۰۱-۳۰
Email: m2.ahmadi@rvsri.ac.ir

چکیده

بیماری نیوکاسل از مسری‌ترین بیماری‌های ویروسی ماکیان با انتشار سریع در سراسر جهان است که با علایم تنفسی، اختلالات عصبی و گوارشی، و تلفات زیاد مشخص می‌شود. ابتلا به این بیماری تاثیر منفی در تجارت صنعت طیور، فرآورده‌های آن‌ها در کشورهای درحال توسعه و کشورهای توسعه یافته می‌گذارد. عامل جزء خانواده پارامیکسوویریده، جنس *Avulavirus* بوده ویروس های مسبب نیوکاسل متعلق به avian paramyxovirus type ۱ (APMV-۱) می‌باشند. هدف از این مطالعه شناسایی، آنالیز فیلوژنی جدایه‌های ویروس نیوکاسل در مرغداری‌های استان مرکزی با استفاده از روش RT- PCR بود. در این تحقیق که با هدف شناسایی و آنالیز فیلوژنی بر اساس ژن F صورت پذیرفت، ۳۰ نمونه شامل مغز،نای، ریه و طحال از مرغ های مبتلا در مزارع مشکوک به بیماری اخذ گردید. نمونه ها پس از آماده سازی در تخم مرغ SPF جنین دار ۹ تا ۱۱ روزه تلقیح گردیدند.پس از ۲ تا ۵ روز مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های مورد آزمایش برداشت شد وجود ویروس به روش HA مورد ارزیابی قرار گرفت. مرحله بعد نمونه‌ها با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن F (۱۳۵۰bp) تحت عملیات RT-PCR قرار گرفت. در این مطالعه تعداد ۱۳ جدایه نیوکاسل مورد تایید قرارگرفت. آنالیز فیلوژنتیکی و رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA صورت پذیرفت. نتایج نشان داد کلیه جدایه‌ها متعلق به ژنوتیپ VII و زیرژنوتیپ VII j می‌باشند. داده‌های بدست آمده جهت گسترش کارآیی برنامه واکسیناسیون و پیشگیری از بیماری و همچنین بکارگیری آن در مسیر ساخت واکسن برعلیه ویروس عامل بیماری نیوکاسل بنیادی می‌باشد.

کلمات کلیدی: بیماریِنیوکاسل، RT-PCR، فیلوژنی، تلقیح، جداسازی،هماگلوتیناسیون

Veterinary Researches & Biological Products No 131 pp: 20-31

Identification and phylogenetic analysis based on Newcastle disease virus gene F isolated from broiler poultry farms in Markazi province

By: Ahmadi, M., (Corresponding Author) Agricultural Research Education and Extension Organization, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak Branch , Iran. Ebrahimi, M. M., Agricultural Research Education and Extension Organization, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Shahsavandi, Sh., Agricultural Research Education and Extension Organization, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Ebrahimi, S., Agricultural Research Education and Extension Organization, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak Branch , Iran. Hamidi, A., Agricultural Research Education and Extension Organization, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak Branch , Iran. and Ghaemmaghami, Sh., Agricultural Research Education and Extension Organization, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak Branch , Iran.

Received: 2019-01-11 **Accepted: 2020-04-18**

Email: m2.ahmadi@rvsri.ac.ir

Newcastle Disease Virus (NDV)is one of the most contagious viral diseases of poultry with rapid spread around the world. It identified by respiratory symptoms, nervous and digestive disorders, and high mortality. NDv causes significant economic losses in poultry industry throughout the world. Avian paramixovirus serotype 1(APMV-1) is a member of family paramyxoviridae, the genus *Avulavirus*, Newcastle disease virus belongs to APMV-1. The aim of this study to recognize and phylogenic analysis of Newcastle disease Virus isolated from poultry farms in Markazi Province by RT-PCR. In this research, recognition and phylogenic analysis was performed based on F gene of Newcastle disease virus. About 30 samples including brain, trachea, lung and spleen were obtained from suspected farms. Then, They were inoculated to 9 - 11 days age SPF embryonic eggs. After that 2-5 days, The Allantoic fluid harvested, the HA test was performed and genetically analysis using specific primer for F gene was done by RT PCR. In this study, Among the samples 13 of them was confirmed as Newcastle disease virus. Phylogeny tree was constructed for F gene using MEGA 6 software. The results showed that all isolates NDV belonged to genotype VII and subgenotype VII-j. These obtained data can use to improve the efficacy of the vaccine and disease prevention program, as well as its use for vaccine production against the Newcastle-disease causative agents.

Key words: Newcastle disease, HA, phylogeny, isolation, inoculation, RT-PCR

مقدمه

بیماری نیوکاسل از مسری‌ترین بیماری‌های ویروسی ماکیان با انتشار سریع در سراسر جهان است که با علایم تنفسی، اختلالات عصبی و گوارشی، و تلفات زیاد مشخص می‌شود. ابتلا ماکیان به این بیماری تاثیر منفی در تجارت صنعت طیور و فرآورده‌های آن‌ها در کشورهای درحال توسعه و کشورهای توسعه یافته می‌گذارد. بیماری اولین بار در سال ۱۹۲۶ در جاوه اندونزی مشاهده گردید و سپس در ۱۹۲۷ به انگلستان گسترش پیدا کرد و در شهر نیوکاسل تشخیص داده شد این بیماری باعث اپیدمیک در آسیا، آفریقا، خاورمیانه و تعدادی کشور در آمریکای جنوبی و مرکز شده است (۹،۳۶). جوجه‌ها به خصوص حساس هستند و ممکن است میزان مرگ و میر و مرگ و میر را تا ۱۰۰٪ تجربه کنند. ویروس نیوکاسل قادر است بیش از ۲۵۰ گونه از پرندگان در ۲۷ راسته را آلوده کند (۲۵). شدت بیماری با توجه به نوع میزبان و سویه ویروس متفاوت می‌باشد. بیماری توسط ویروسی از خانواده پارامیکسوویریده، جنس *Avulavirus* ایجاد می‌گردد. تاکنون ۱۲ سروتیپ (APMV-۱, ۱۲) در پرندگان شناسایی شده است. ویروس‌های عامل نیوکاسل متعلق به avian paramyxovirus type ۱ (APMV-۱) میباشد. (۲۵،۳۶). ویریون چند شکلی (گرد، رشته‌ای)، پوشش‌دار به قطر ۱۵۰ تا ۳۵۰ نانومتر است و ژنوم RNA تک رشته‌ای آن با اندازه ۱۳ تا ۱۹ کیلوباز شش ژن(۳`-NP-P-M-F-HN-L-۵`) شامل نوکلئوپروتئین (NP)، فسفوپروتئین (P)، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، هماگلوتینین-نورآمینیداز (HN) و RNA پلی مراز(L) را رمزدهی می‌کند. RNA فسفوپروتئین P پردازش شده و دو محصول پروتئینی V و W تولید می‌کند. گلیکوپروتئین‌های سطحی F و HN امکان اتصال و فیوژن ویروس به سلول‌های میزبان را در آغاز آلودگی فراهم می‌کنند بدین ترتیب که پس از اتصال هماگلوتینین به سلول میزبان، گلیکوپروتئین F در pH خنثی با غشای سلول ادغام شده و نوکلئوکپسید ویروس به داخل سلول رها می‌شود. سپس RNA ژنومی توسط RNA پلی‌مراز ویروسی نسخه‌برداری شده، بیان ژن و تکثیر آن صورت می‌پذیرد. در نهایت

ویروس با جوانه زدن از غشای سلولی خارج می‌شود. ویروس در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد پایدار نبوده و به دترجنت‌ها، حلال های چربی، فرماالدئید و عوامل اکسیدکننده حساس می‌باشد (۹،۱۲،۱۹،۲۳،۲۶).

بر اساس حدت ویروس بیماری در طیوربه ۵ گروه تقسیم می‌شود.

۱- وی سروتروپیک ولوژنیک (Doyle's form): فرمی با بیماری‌زایی بالا همراه با ضایعات هموراژیک روده‌ای.

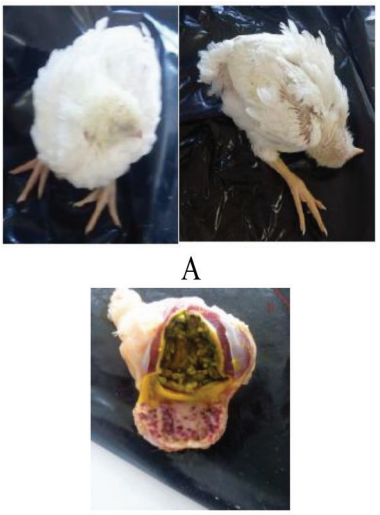
۲- نروتروپیک ولوژنیک (Beach form):فرمی با مرگ و میر بالا که معمولا با علائم تنفسی و عصبی همراه است.

۳-مزوژنیک (Beudette's form) فرم مزمن با علائم تنفسی،گاهی عصبی و لی با مرگ و میر کم.

۴-لنتوژنیک یا تنفسی (Hitchner's form) فرمی با عفونت تنفسی تحت بالینی و متوسط.

۵-آسیمپوماتیک (بدون علائم) انتریک: (beard and hanson ۱۹۸۴) فرمی که معمولا شامل عفونت تحت بالینی روده‌ای می‌باشد.

با این حال این فرم‌های بالینی از بیماری، لزوما واضح نیست و می‌تواند همپوشانی داشته باشد (۴،۲۵،۲۶،۳۷). عامل بیماری می‌تواند از طریق تماس مستقیم با پرندگان آلوده و ترشحات دهان، بینی و چشم‌ها منتقل گردد. مواد آلوده (فضولات، لوازم مرغداری)، خوراک و آب می‌تواند باعث گسترش بیماری شود. بیماری بر اساس تاریخچه، علائم و آزمون آزمایشگاهی تشخیص داده می‌شود. از جمله روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مورد استفاده الایزا، HI،HA، RT PCR می‌باشد. علائم



A

B

شکل ۱- نمونه های تهیه شده از مزارع مشکوک: تصویر A نمونه ای از مرغان مبتلا به بیماری نیوکاسل با علائم بالینی بی حالی، فلجی پاها و عصبی (پیچش گردن). B یک نمونه از مرغ مبتلا به بیماری نیوکاسل نوع گوارشی با نشانه خونریزی شدید(پتشی) در پیش معدی آن.

کلینیکی اکثرا شامل کم اشتهایی، افسردگی، ضعف، اسهال سبز، با دهان باز نفس کشیدن، سرفه، فلجی بال‌ها و پاها، تاج و ریش (wattle) ممکن است آبی و سیانوزشدن می‌باشد. روش موثر در کنترل و پیشگیری از بیماری برنامه مدون واکسیناسیون با استفاده از واکسن‌های رایج و دردسترس می‌باشد (۱۲،۳۶).

نیوکاسل فوق حاد در ایران بومی است و واکسیناسیون علیه آن در طیور صنعتی و بومی کشور انجام می‌شود. اما هنوز از عمده‌ترین مشکلات صنعت طیور بوده و هر ساله در کشور موارد بیماری گزارش می‌گردد(۲)، و یک عامل محدودکننده مهم در صنعت طیور می‌باشد. واکسیناسیون می‌تواند به شدت تحت تاثیر مایکوتوکسین‌ها، عفونت همزمان، ویروس‌های سرکوب‌کننده ایمنی مانند گامبورو، مارک یا کم خونی عفونی و عوامل محیطی قرار گیرد. جهت ایجاد بهترین حفاظت در مقابل چالش با نیوکاسل باید تمامی این عوامل را مد نظر قرار داد (۲۰). پروتئین F نقش اساسی در بیماری‌زایی دارد و طبق مطالعات ملکولی، پاتوزنیسیتی ویروس نیوکاسل به ترتیب اسیدهای آمینه آن در ناحیه شکاف بستگی دارد (۳۰،۳۸). از طرفی پروتئین HN این پروتئین را همیاری می‌کند پروتئین F بصورت F۰ اولیه غیر فعال سنتز شده و سپس توسط پروتئاز سلولی به فرم فعال یا ۲ زیر واحد F۱ , F۲ تجزیه می‌گردد. پس از اتصال پروتئین F به سلول در pH نرمال، مولتی نوکلئوتید (سینستیا) تشکیل شده که پیامد آن نکروز بافتی و گسترش ویروس می‌باشد. تجزیه پروتئین F در سطح وسیعی از بافت‌ها مسئول گسترش سیستمیک ویروس بیماری نیوکاسل و همچنین حدت آن بوده و مشاهده شده که سویه‌های حدت‌دار ویروس نیوکاسل محتوی لیزین (K) و آرژنین (R) در جایگاه تجزیه هستند(R-R-Q-Q/K-R) و فنیل آلانین در موقعیت ۱۱۷ F۱ است این مکان بوسیله پروتئازهای داخل سلولی شناخته می‌شود (۹،۲۷،۳۸). سالیانه در کشور۸۸۰ میلیون قطعه جوجه‌ریزی گوشتی می‌شود و استان مرکزی با دارا بودن ظرفیت ۱۲۷۷۹۲۸۴ قطعه توان جوجه‌ریزی گوشتی، سهم مهمی در تولید گوشت سفید دارد (۳۹). با توجه به اهمیت تولید پروتئین از نظر امنیت زیستی و خطر ابتلا و تلفات بالای بیماری در طیور، شناسایی عوامل رایج عامل بیماری و همسویی آن با واکسن‌های در دسترس جهت پیشگیری و کنترل بیماری اهمیت دارد. تحقیق حاضر با توجه به اهم بودن شناسایی سروتیپ‌های عوامل بیماری در استان مورد اجرا قرار گرفت.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه از مهر ماه سال ۹۶ تا خرداد ماه سال ۹۷ از ۳۰ مزرعه مشکوک به بیماری نیوکاسل در سطح استان مرکزی نمونه‌گیری به عمل آمد (شکل ۱). از هر مزرعه بین ۵ تا ۱۰ قطعه مرغان تلف شده و تعدادی ۲ الی ۳ قطعه از مرغان زنده تهیه گردید. سپس از اندام‌های مغز، نای، ریه و طحال نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها تا قبل از تلقیح به تخم‌مرغ جنین‌دار وآزمون ملکولی در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تلقیح به تخم‌مرغ جنین‌دار

ابتدا به میزان ۱۰۰ mg از بافت (معمولا مغز) در لوله ۲ میلی‌لیتری قرار

داده شد و سپس با افزودن ۱ میلی‌لیتر از محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین -استرپتوماسین (sigma p۴۳۳۳) و محلول ضد قارچ نیستاتین (شرکت جابربن حیان) به خوبی هموژن گردید. سپس در ۴۰۰۰ دوردردقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma) گردید و مایع‌رویی از فیلتر۲۲/ (Sartorius) عبور داده شد. سپس ۲/. میلی‌لیتر از مایع فیلتر شده توسط سرنگ انسولین زیر هود لامینار فلو در شرایط استریل به داخل حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ SPF جنین‌دار ۱۱-۹ روزه تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تلقیح گردید (۲۶). بدین صورت که ابتدا تخم‌مرغ‌ها را نوربینی نموده محل جنین و موقعیت آن شناسایی گردید. سپس زیر هود لامینارفلو پوسته تخم‌مرغ در محل کیسه هوایی با بتادین ضدعفونی شده و با سرسوزن استریل محل تزریق تعیین و سوراخ‌ریزی ایجاد شد. سپس با سرنگ انسولین نمونه آماده شده به حفره آلانتوئیک تزریق گردید. سوراخ توسط نوار چسب شیشه ای تمیز مسدود شد. تخم‌مرغ‌ها، بطور روزانه و به مدت ۵ روز نوربینی شدند. تلفات ۲۴ ساعت اول حذف گردید و از ۴۸ ساعت پس از تلقیح، جنین‌های تلف شده جمع‌آوری و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. روز پنجم بقیه تخم‌مرغ‌های تلقیح شده برداشته و به یخچال منتقل شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها از یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد خارج شده و در شرایط کاملاً استریل در زیر هود لامینار فلو، پوسته تخم‌مرغ‌ها در محل کیسه هوایی مجدد با بتادین ضدعفونی شد. توسط قیچی استریل پوسته کسیه هوایی کاملا برداشته شده و توسط یک سرنگ استریل مایع آلانتوئیک به آرامی برداشته شد و در لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری و یک نمونه هم در میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری استریل جمع‌آوری گردید. پس از آزمایش هماگلوتیناسیون نمونه‌های مثبت جهت استخراج RNA و تست RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های منفی ۳ بار در تخم‌مرغ جنین‌دار SPF پاساژ داده شدند تا از منفی بودن آنها اطمینان حاصل شود.

آزمون HA

ابتدا برای تهیه RBC، با استفاده از یک سرنگ استریل آغشته به هپارین بطور مستقیم از قلب جوجه SPF خون‌گیری بعمل آمد. پس از انتقال خون به لوله ونوجکت تمیز در۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید گلبول قرمز جداسازی گردید. گلبول‌ها با ساتفاده از سرم فیزیولوژی استریل ۴ مرتبه شستشو شده و از رسوب RBC بدست آمده محلول ۱۰ ٪ گلبول قرمز تهیه گردید. جهت تست آگلوتیناسیون سریع، ۵۰ میکرولیتر از مایع آلانتوئیک برداشت شده با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون RBC آماده شده روی صفحه سرامیک سفید قرار داده شد. به آرامی سوسپانسیون گلبول قرمز و مایع آلانتوئیک مخلوط گردید و صفحه سرامیکی بطور آهسته بصورت دورانی به مدت ۵ دقیقه حرکت داده شد سپس از نظر وجود و عدم وجود آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون از واکسن لاسوتای موسسه رازی بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید(۳۲).

آزمون RT-PCR

در این قسمت از نمونه‌های بافتی و هم از نمونه مایع آلانتوئیک که تست HA آنها مثبت بود استفاده گردید. برای استخراج RNA از بافت‌ها، نمونه‌ها در PBS استریل هموژن شده سپس در ۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. طبق دستور العمل کیت استخراج RNA ویروس (high pure viral RNA kit ,roche) ۲۰۰ ماکرولیتر از مایع رویی) یا ۲۰۰ ماکرولیتر از مایع آلانتویئک HA مثبت (برای تخلیص برداشته شد و توسط نانودراب (۲۰۰۰ Thermo) میزان غلظت RNA سنجش گردید. نمونه‌ها تا قبل از آزمون RT PCR در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تست RT-PCR از کیت تک مرحله‌ای (شرکت اینترون کشور کره) استفاده گردید و به منظور تکثیر یک قطعه ۱۳۵۰ جفت بازی از یک جفت پرایمر طراحی شده رفت و برگشت

جدول ۱- مشخصات مراحل و دمای مورد استفاده در RT_PCR جهت تکثیر ژن F : مرحله RT شامل یک سیکل ۶۰ دقیقه ای با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد جهت تهیه cDNA از RNA ویروسی براساس رونوشت برداری معکوس و یک سیکل با دما ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله PCR محتوی یک سیکل ۹۴ یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه در ۴۰ سیکل و یک سیکل ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه.

step	دمای/سانتیگراد	زمان/دقیقه	تعداد سیکل
RT ۱	۴۵	۶۰	۱
PCR	۹۵	۵	۱
	۹۵	۱	۳۵
	۵۵	۱	
	۷۲	۲	
	۷۲	۱۰	۱

`۵ :R ,`TACCTCTATCCCTAGGATACAAGAGTCTG۳`۵:F) `GATCTAGGGTATTCCCAAGCCA۳`) استفاده به عمل آمد (۳۸). (جدول ۱). پس از آزمون RT- PCR، ۱۰ میکرولیتر از محصول آغشته به سایبرگرین در کنار مارکر ۱۰۰ جفت بازی (اینترون کره) بر روی ژل آگارز ۱٪ لود و در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز گردید. باند تشکیل شده توسط ژل داکت مشاهد شد. نمونه‌های مثبت با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (Accuprep PCR purification kit, BIONEER) تخلیص و جهت توالی یابی به کشور کره (شرکت بایونیر) ارسال گردید. پس از توالی‌یابی، با استفاده از نرم‌افزار MEGA۶ درخت فیلوژنی، نزدیکی ویروس‌های جدا شده و کلاس آنها بررسی گردید.

نتایج

در این پژوهش از ۳۰ گله با علائم بیماری‌های تنفسی مشکوک به بیماری نیوکاسل شامل ۲۹ گله گوشتی و یک گله مرغ بومی بودند نمونه بافت تهیه گردید. پس از تلقیح در تخم‌مرغ جنین‌دار، مایع آلانتوئیک برداشت شد. از این تعداد ۲۰ نمونه در آزمون هماگلوتیناسیون سریع مثبت گردید. تست ملکولی RT-PCR بروی نمونه‌های HA مثبت انجام شد و براساس نتایج بدست آمده ۱۳ مزرعه از نظر ویروس نیوکاسل مثبت تشخیص داده شدند.

تست HA

از ۳۰ نمونه بافتی تلقیح شده در تخم‌مرغ جنین‌دار (۱۱-۹ روزه) تعداد ۲۰ نمونه(جدول ۲) در آزمون HA سریع مثبت (شکل ۲) مشاهده گردید.

آزمون RT_PCR و ژل الکتروفورز

پس از آنکه تعداد ۲۰ مورد از نظر آزمایش HA مثبت تشخیص داده شد. آزمون RT-PCR اجرا گردید. سپس با استفاده از سیستم ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با Safe Red بوسیله ژل داکت ژن F تکثیر شده (۱۳۵۰ جفت باز) مشاهده گردید (شکل ۳). از مجموعه آنها تعداد ۱۳ نمونه (۷ مورد از نای و ۶ مورد از مغز) تکثیر ژن F صورت گرفت و مثبت شناسایی گردید (جدول ۳). در این آزمون از واکسن لاسوتای موسسه رازی به عنوان

جدول ۲- نتایج آزمون HA جدایه ها از مایع آلانتوئیک برداشت شده که از بین ۲۰ نمونه ۱۰ مورد از نای و ۱۰ مورد از مغز مثبت تشخیص داده شد.

ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
کد مرغداری	۱۰۰	۱۰۱	۱۰۲	۱۰۵	۱۰۶	۱۰۷	۱۰۸	۱۰۹	۱۱۰	۱۱۱	۱۱۲	۱۱۳	۱۱۴	۱۱۵	۱۱۶
بافت	نای			مغز		نای		نای	نای	نای	مغز	مغز		نای	نای
ازمونHA	+	_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	+	+
ردیف	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰
کدمرغداری	۱۱۷	۱۱۸	۱۱۹	۱۲۰	۱۲۱	۱۲۲	۱۲۳	۱۲۴	۱۲۵	۱۲۶	۱۲۷	۱۲۸	۱۲۹	۱۳۰	۱۳۱
بافت	نای		نای			مغز	مغز		مغز	مغز	مغز	نای	مغز	مغز	
ازمونHA	+	_	+	_	_	+	+	-	+	+	+	+	+	+	_

جدول ۳- نتایج جدایه های مثبت ویروس نیوکاسل در آزمون RT-PCR که در مجموع ۱۳ گله(۷ مورد از نای و ۶ موردن از مغز) مثبت شدند.

ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
کد مرغداری	۱۰۷	۱۰۹	۱۱۱	۱۱۲	۱۱۶	۱۱۸	۱۲۳	۱۲۴	۱۲۵	۱۲۷	۱۲۸	۱۲۹	۱۳۰
بافت	نای	نای	نای	مغز	نای	نای	مغز	نای	مغز	مغز	نای	مغز	مغز
RT PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

کنترل مثبت استفاده گردید.

فیلوژنی

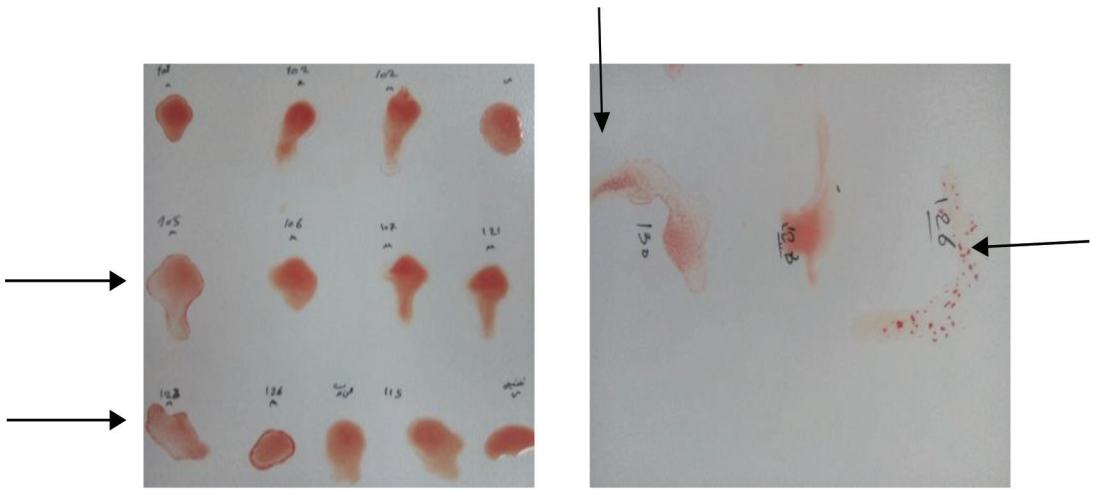
پس از توالی‌یابی، با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۶ درخت فیلوژنی، نزدیکی ویروس‌های جدا شده و کلاس آن‌ها بررسی گردید (دیاگرام ۱ و ۲). تمامی جدایه‌ها در ژنوتیپ ۷ و در پردازش‌هاي بعدي در زیر ژنوتیپ VII-j قرار گرفتند.

بحث

بیماری نیوکاسل یکی از وخیم‌ترین عفونت‌های طیور و آندمیک در صنعت طیور ایران می‌باشد (۶،۱۰،۱۴). هرساله گزارشی از شیوع نوع ولوژنیک نیوکاسل با مرگ و میر بین پرندگان گوشتی، تخم‌گذار ارائه می‌شود (۱۴). از آنجایی که اولین شیوع بیماری نیوکاسل در ۱۹۲۶ صورت گرفت ظهور ژنوتیپ‌های در هر دو کلاس I و II ویروس حاکی از تنوع و بطور مداوم دگرگونی گروه ویروس‌ها است (۶،۱۸). به نظر می‌رسد ویروس بیماری نیوکاسل علت بیماری مرگبار مرغ در سراسر جهان است و فاکتورهای متعددی مانند سازگاری میزبان، فرار از پاسخ ایمنی و فشارهای انتخابی پیشنهاد شده است که موجب دگرگونی ویروس‌ها و ظهور انواع ژنتیکی شود (۷) .

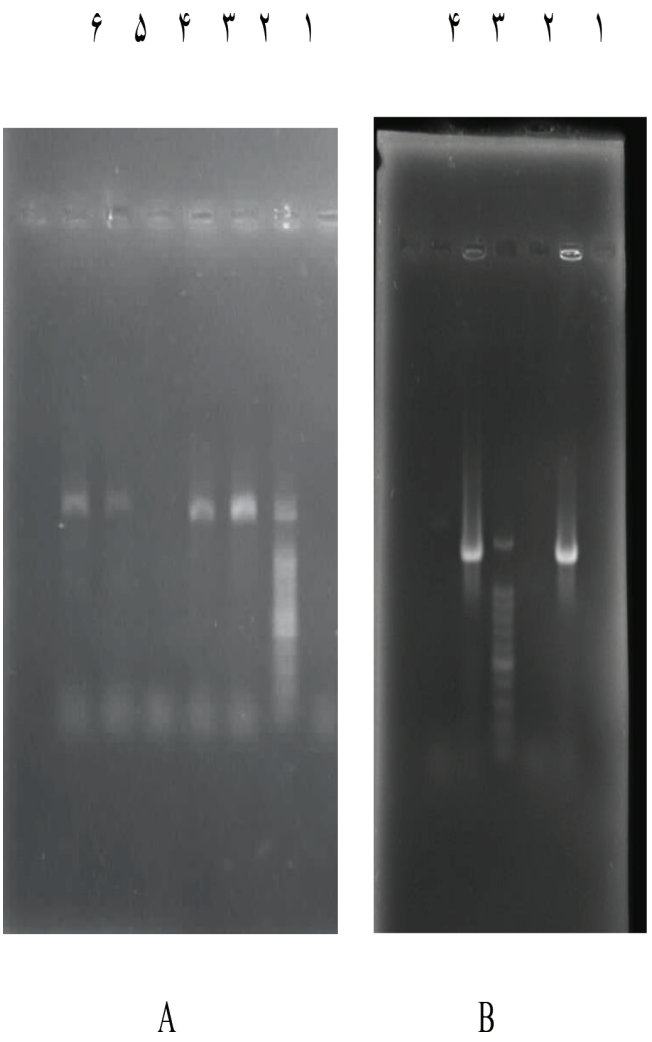
در این مطالعه از مجموع ۳۰ گله نمونه‌برداری شده پس از تلقیح به تخم مرغ جنین‌دار و برداشت مایع آلانتوئیک تعداد ۲۰ مورد (۱۰ مورد نای و ۱۰ مورد مغز) در تست HA سریع مثبت شدند این حاکی از رشد ویروس‌هایی است که توانایی آگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز مرغ را دارند (سه عامل بیماری تنفسی طیور نیوکاسل، آنفلوانزا و برونشیت عفونی) و ۱۰ نمونه دیگر منفی شدند. درتست ملکولی بطور مستقیم بر روی بافت‌ها تنها ۲ مورد از بافت نای مثبت شناخته شد. اما از جدایه‌های مایع آلانتوئیک ۵ مورد از نای و ۶ مورد از مغز که تست HA آنها هم مثبت بود ویروس نیوکاسل تشخیص داده شد. بقیه ۷ جدایه HA مثبت از نظر ویروس بیماری نیوکاسل منفی شناخته شد و می‌توانند ویروس آنفلوانزا باشد که نیاز به مطالعات تکمیلی برای شناسایی نوع ویروس دارد.

بررسی‌های اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که ژنوتیپ‌های I تا IV و ژنوتیپ IX در دهه‌های ۳۰ تا ۶۰ میلادی ظاهر شدند و به عنوان ژنوتیپ‌های اولیه در نظر گرفته می‌شوند. بیش از ۴۰ سال است که از سویه‌های ژنوتیپ II برای ساخت واکسن‌های زنده علیه NDV استفاده می‌شود. اولین جدایه بیماری‌زا که در سال ۱۹۴۸ میلادی در چین جدا شد و همچنان در مرغ و اردک اهلی در آسیا در گردش است، به ژنوتیپ IX تعلق دارد. ژنوتیپ‌های V، VI، VII، VIII، XI پس از دهه ۶۰ میلادی گزارش شدند. رایج‌ترین ژنوتیپ‌ها در سراسر جهان که شامل ویروس‌های بیماری‌زا هستند عبارتند از V،VI، VII و VIII. در این بین ژنوتیپ V در دهه ۷۰ میلادی برای اولین بار گزارش شد و غالباً در آمریکای مرکزی و جنوبی از گونه‌های مختلف طیور و در آمریکای شمالی از قره قاز جدا شده است. ژنوتیپ VI شامل سویه‌هایی است که از گونه‌های متنوع پرندگان جدا شده است اما به دلیل بروز مکرر آن‌ها در کبوتر و قمری، خطر آلوده کردن گله طیور را دارند. ژنوتیپ VII در آسیا و منطقه خاورمیانه غالب است. ژنوتیپ‌های X تا XV دارای ویژگی‌های اپیدمیولوژیک مختلف و منشا جغرافیایی متفاوتی هستند. به جز جدایه‌های متعلق به ژنوتیپ XIV که اغلب از آفریقای مرکزی و جنوبی گزارش شده‌اند،



شکل ۲- - نتایج بدست آمده از آزمون HA سریع : تصویر A پاسخ مثبت جدایه های ۱۲۶ آگلوتیناسیون شدید و ۱۳۰ متوسط از مغز ، تصویر B نتایج دیگر نمونه ها که جدایه های ۱۰۶، ۱۰۷، ۱۱۵، ۱۲۱، همه منفی و جدایه های ۱۰۵، ۱۲۸، ۱۰۱، ۱۰۲ از مغز همه مثبت شدند.

دیگر ژنوتیپ‌ها از غازها، پرندگان ساحلی و مرغان دریایی در آمریکای جنوبی و چین جدا شده‌اند. ژنوتیپ‌های XVI در جمهوری دومنیکن در سال ۲۰۰۸، و XVII و XVIII در آفریقای مرکزی و جنوبی در سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۱ گزارش شده‌اند (۱۷،۱۸). بسیاري از ويروس‌هاي جدا شده از نمونه‌هاي بالیني در ژنوتيپ‌هاي V، VII و VIIIو زير ژنوتيپ‌هاي متعدد خوشه‌بندي مي‌شوند. ويروس‌هاي ژنوتيپ‌هاي VII و VIII از گستردگي انتشار بيش‌تري برخوردارند (۱۹،۲۰). زير ژنوتيپ‌هاي VIIa-VIIe مسوول رخدادهاي اخير بيماري نيوكاسل در چين، مالزي، قزاقستان و قرقيزستان معرفي شده و زير ژنوتيپ‌هاي VIIf-VIIh بيش‌تر از آفريقا

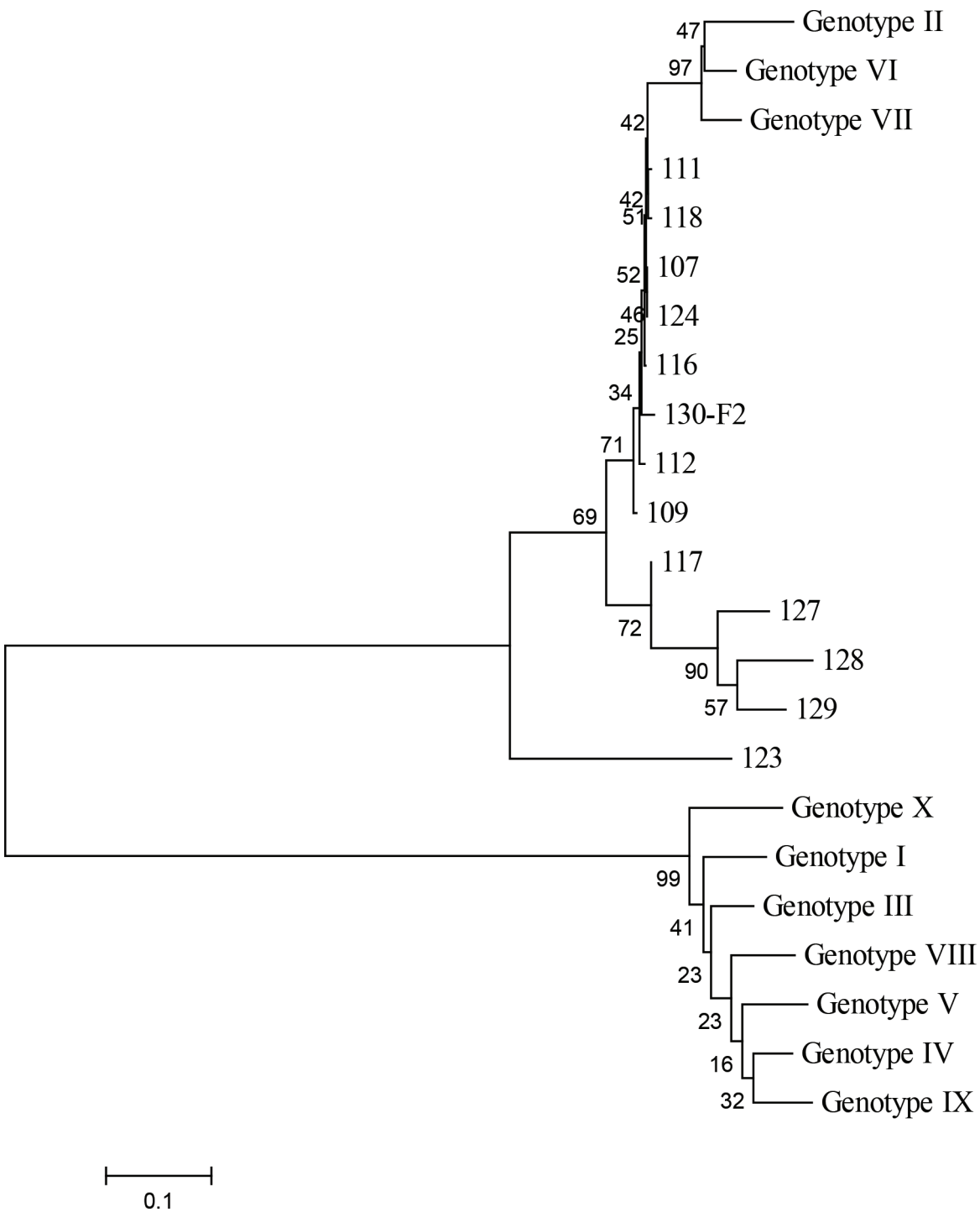


شکل ۳- نتایج حاصل از آزمایش RT-PCR (۱۳۵۰bp) بر روی ژل الکتروفورژ ۱٪ : تصویر A موارد مثبت آزمون ملکولی از نای(ستون۱ مثبت، ۲ منفی، ۳ مارکر و ۴ کنترل مثبت و B موارد مثبت مغز (ستون ۱ مارکر، ستون های ۲،۳،۵،مثبت و ۴ منفی و ۶ کنترل مثبت) با مارکر ۱۰۰bp.

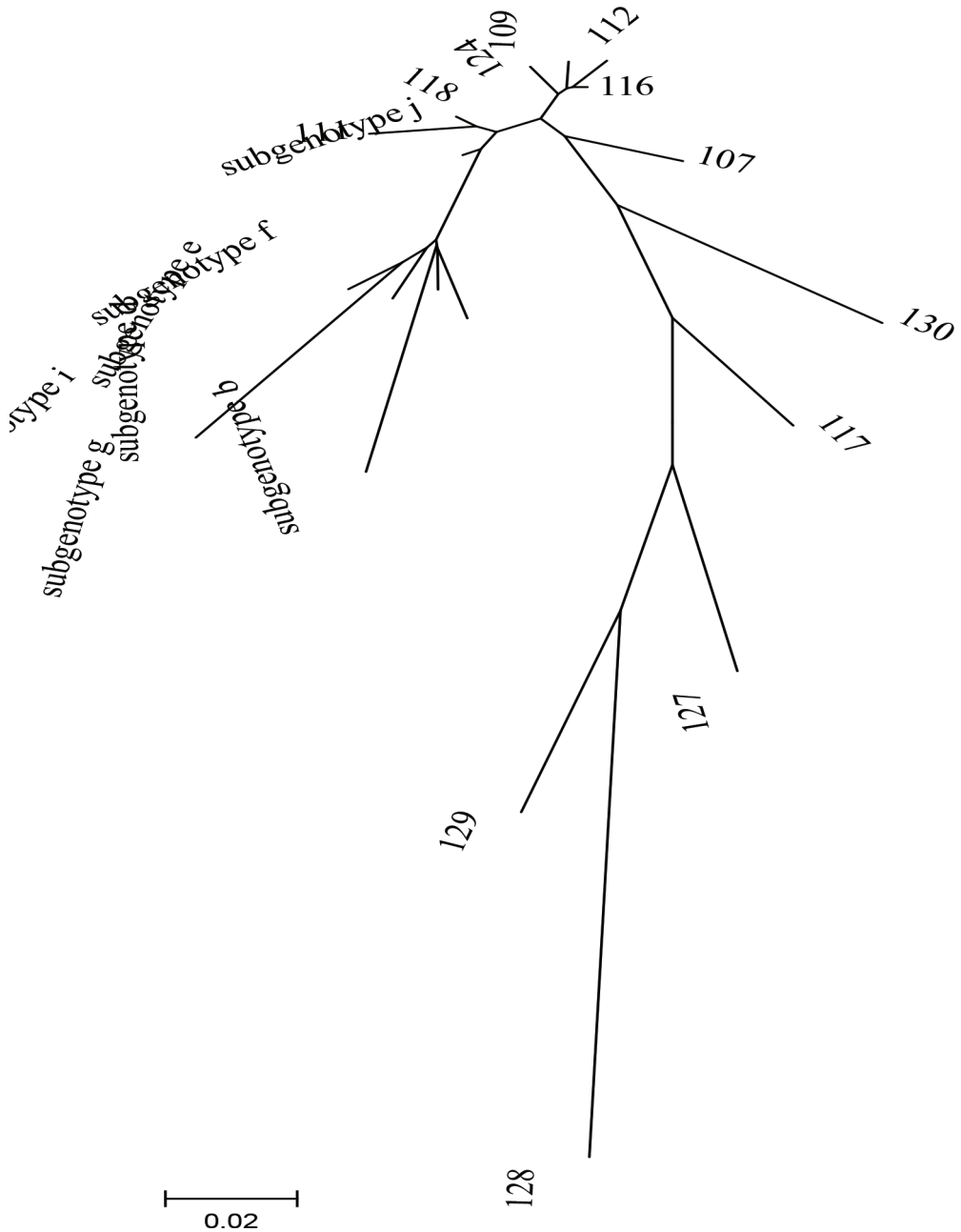
گزارش شده‌اند (۳،۳۱،۳۳). مطالعه ابراهيمي و همكاران، حسيني و همكاران، صمدی و همکاران، برومند و همکاران و کیانی‌زاده و همکاران نشان‌دهنده غالب بودن ژنوتیپ VII در ایران است (۴،۱۴،۱۶،۲۸).

Qianqian در سال ۲۰۱۷ طی یک بررسی بر روی جدایه‌های ویروس از غازها و مرغ در چین نشان داد اکثر نمونه‌های مرغی و ۲ نمونه از غازها در class II و ژنوتیپ VIId قرار گرفت و دیگر جدایه‌های غازها در class II و ژنوتیپ II تعلق گرفت (۳۵). همچنین Wang در سال ۲۰۱۸ بر روی جدایه‌های از اردک و کبوتر نشان داد که ویروس جزء classII و ژنوتیپ II هستند (۳۴). Afzal در ۲۰۱۵ با بررسی ویروس‌های جدا شده در پاکستان اکثر انها را ولوژنیک تشخیص داد (۱). از طرفی Farooq در سال ۲۰۱۴ طی یک مطالعه در ایالت پنجاب در کشور پاکستان نشان داد که مسئول شیوع بیماری در این ایالت سویه ولوژنیک بوده که آن در class II و ژنوتیپ VII خصوصا ژنوتیپ VII e قرار داشت (۸). Siddique طی یک مطالعه در سال ۲۰۱۳ از بین جدایه‌های ویروس نیوکاسل در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۳ نشان داد که ۲۶ جدایه جزء ولوژنیک class II، ۱۱ جدایه آن جزء VII b و ۱۵ جدایه دیگر در زیرژنوتیپ VII f شناسایی شد که در طیور صنعتی پاکستان در حال گردش می‌باشد (۲۹).

میاحی در سال ۲۰۱۷ طی یک مطالعه بر روی جدایه‌های بدست امده طی سال‌های ۱۹۹۵ الی ۲۰۱۶ در سطح ایران نشان داد که بر اساس دگرگونی‌های ناشی از جهش‌های نطقه‌ای، زیر ژنوتیپ‌های VIg، VIj، XIIIa، VIId، VIIj و XIIId در طی یک دوره ۲۱ ساله در این کشور منتشر شده است. مطالعات متعدد بیانگر وجود زیرژنوتیپ‌های مختلف در ایران است (۲۱). در تابستان ۱۳۸۸ فتحی و همکارانش طی یک بررسی ملکولی براساس ژن F، آلودگی ۱۵ گله مرغ را در استان چهار محال بختیاری بررسی کردند که قرابت ژنومی با سویه‌های ایتالیایی و روسی نشان دادند (۳۸). در سال ۱۳۹۰ خوب یار و همکارانش از بین ۳۰ واحد مرغداری در استان فارس تعداد۱۰ نمونه مثبت جداسازی نمود. سویه‌های ولوژنیک، مزوژنیک و لنتوژنیک به ترتیب در ۳، ۶ و ۱ نمونه شناسایی کردند (۳۷). ابراهیمی با مطالعه ژنتیکی بر روی ۵۱ جدایه در آسیا طی سال‌های ۲۰۰۸ تا۲۰۱۱ نشان داد که ژنوتیپ VII غالب در سطح آسیا بین طیور اهلی غالب است و زیر ژنوتیپ VIIb در کشورهای ایران و شبه قاره هند در گردش است درحالیکه VIId در کشورهای خاور دور وجود دارد (۶). قلیانچی لنگرودی در سال ۲۰۱۲ از مازندران ۳ جدایه با علائم عصبی تهیه نمود که پس از مطالعه ملکولی همه آنها سویه ولوژنیک، در class II و به ۲ جدایه جزء ژنوتیپ VIIb و یک جدایه ژنوتیپ VIId تعلق گرفت (۱۰). همچنین قلیانچی در مطالعه دیگر خود بر روی یک جدایه از کبوتر، یک جدایه شتر مرغی و ۵ جدایه از مرغ بدست آمده در طی سال‌های ۸۹ الی ۹۱ نشان داد که جدایه‌های حاصل از ماکیان و شتر مرغ بسیار نزدیک بودند و اکثر آنها ژنوتیپ VII تشخیص داده شد ولی جدایه کبوتر در ژنوتیپ V قرار گرفت (۱۱). مهربان‌پور در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای در استان فارس،۱۰ جدایه از مرغداری‌های سطح استان بدست آورد که جدا شده در class II و ژنوتیپ III طبقه‌بندی شده و شامل موارد ولوزنیک، مزوزنیک و لنتوژنیک گردید (۲۲). حسینی در سال ۲۰۱۴ تعداد ۹ جدایه از سطح کشور بدست آورد که در classII و جزو ژنوتیپ VIId قرار گرفتند (۱۴). اسماعیل‌زاد در ۲۰۱۷ طی یک بررسی نشان داد



دیاگرام ۱- درخت فیلوژنی براساس توالی ژن F (۱۳۵۰bp) جدایه های بدست آمده و ویروس های مرجع هر ژنوتیپ با استفاده از MEGA ترسیم شده است. فاصله با روش Maximum Composite Likelihood و براساس جایگزینی هر باز نوکلئوتیدی و یک‌هزار بار تکرار محاسبه شده است. این جدایه ها در یک شاخه در زیر ژنوتیپ VII-j قرار گرفتند.



دیاگرام ۲- تعیین زیرژنوتیپ ویروس‌هاي نیوکاسل جدا شده از مزارع استان مرکزی: توپولوژي درخت فیلوژني رسم شده با MEGA و براساس جایگزیني هر باز نوکلئوتیدي و یك‌هزار بار تکرار محاسبه، بیانگر این است که این جدایه ها مشابه و در زیر ژنوتیپ VII-j قرار می گیرند.

که جدایه‌های جدید ویروس از ایران به ژنوتیپ VII در یک ژنوتیپ متمایز جدید با نام ز-VII تعلق دارند. این زیر ژنوتیپ جدید ۳٪ تفاوت از ژنوتیپ VIId را نشان داد (۷). بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها، جدایه VIg دارای بیشترین هویت توالی با جدایه‌های روسی و لهستانی زیر ژنوتیپ VIg بود، در حالی که جدایه‌های زیر ژنوتیپ VIj (۲۰۱۲) بیشتر شبیه به یک ویروس جدا شده در سال ۲۰۱۵ در هند بود. تجزیه و تحلیل اختلاف تکاملی زیر ژنوتیپ VIIj نشان می‌دهد که ویروس‌های چینی و اوکراینی ممکن است نقش مهمی در ظهور جدایه‌های VIIj داشته باشند. همچنین مطالعات متقابل تکاملی نشان داد که جدایه‌های XIIIa در ایران ممکن است سبب ظهور انواع سازگار با زیر ژنوتیپ XIIId شود (۶،۱۷). در این مطالعه از تعداد ۲۹ مرغداری صنعتی و یک مرغداری بومی مشکوک نمونه مغز، نای، ریه و طحال تهیه گردید. تعداد ۱۳ جدایه مربوط به ۱۳ مرغداری در آزمایش ملکولی براساس ژن F (۱۳۵۰bp) مثبت تشخیص داده شد. در این بین ۱۱ مورد مثبت از جدایه‌های ویروس در تخم‌مرغ جنین‌دار بود و تنها ۲ مورد تست ملکولی بر روی بافت بطور مستقیم مثبت شد. که نتیجه تشخیص نیوکاسل بروی مایع آلانتوئیک اکثر مطالعات اشاره شده می‌باشد و تنها یک مورد فتحی و همکارانش موفق به شناسایی مستقیم از بافت طیور شدند.

پس از توالی‌یابی محصول حاصل از آزمون ملکولی براساس ژن F با استفاده از نرم افزار MEGA ۶ و ارزیابی آنها، کلیه جدایه‌ها از کلاس II بوده و در ژنوتیپ VII و زیر ژنوتیپ VIIj قرار گرفتند. مطالعه حاضر یافته‌های قبلی محققین مبنی بر دخالت ژنوتیپ VII در بیماری نیوکاسل در ایران را تایید می‌نماید. همچنین در این بررسی حضور زیر ژنوتیپ VII ز در کشور و استان مرکزی به اثبات رسید. از طرفی با استفاده از تکنیک ملکولی RT PCR براحتی میتوان عامل بیماری را در گله‌های مشکوک تشخیص داد. در نهایت با برنامه‌ریزی صحیح می‌توان حضور عامل عفونت را در سطح کشور شناسایی و با مطالعات ژنتیکی و فیلوژنتیکی تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی را مورد بررسی قرار داد و از آن در خصوص برنامه‌ریزی صحیح واکسیناسیون و در صورت لزوم تغییرات سویه واکسینال با توجه به منطقه جغرافیای استفاده بعمل آورد.

پیشنهادات

با توجه به واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل در سطح استان و کشور، متاسفانه مواردی از بیماری در مرغداری‌های صنعتی اتفاق می‌افتد که می‌تواند تهدید جدی برای صنعت طیور محسوب گردد. لذا با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌گردد:

۱-مطالعات اپیدمیولوژیکی و بررسی ژنتیکی در سطح استان و کشور ادامه یابد.

۲-با بکارگیری نتایج در سطح کشور و مقایسه آنها با یکدیگر، اختلافات بررسی شده و در صورت لزوم تغییرات لازم در سویه واکسینال صورت پذیرد.

۳- چالنج مرغ‌های واکسینه شده با استفاده از جدایه‌های بدست آمده صورت پذیرد تا توانایی ایمن‌سازی واکسن‌های موجود (خارجی و داخلی) با توجه به سویه‌های شایع در کشور و استان محک زده شود.

تشکر و قدردانی

این طرح پژوهشی با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی منطقه مرکزی (شعبه اراک) انجام گرفت. لذا بدینوسیله از آقای دکتر مجید ترابی گودرزی ریاست سابق شعبه که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند صمیمانه تشکر می‌نمایم . همچنین از آقای علی مصلح‌آبادی کارپرداز موسسه در خصوص پیگیری‌های خرید مواد آزمایشگاهی و دیگر همکاران تشکر و تقدیر می‌نمایم در ضمن از آقای دکتر امینی مقدم همکار بخش خصوص درخصوص همکاری در جمع‌آوری نمونه‌های مورد نیاز از مزارع سطح استان کمال تشکر و قدر دانی دارم. و نهایتا از اداره کل دامپزشکی استان مرکزی از آقایان دکتر شانقی، حمزه لوئیان نیز جهت اطلاع‌رسانی و ارسال نمونه‌های مشکوک صمیمانه متشکر و سپاسگزارم.

منابع مورد استفاده

1- Afzal, F., Saliha, U. (2015). Isolation characterization of Newcastle disease viruse & comparitive efficacy of different vaccine regimes in broiler birds. *The journal of animal & plant sciences,* 25(4): page:971-976.

2-Atyabi N., Alemohammad H. (2017) . Serological valuation of Newcastle disease vaccination titer in the broiler farms of Mazandaran province during 2014-2017; veterinary Researches & Biological products NO 118, pp:58-64.

3-Bogoyavlenskiy, A., Berezin, V., Prilipov, A., Usachev, E., Lyapina, O. (2009). Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIId. Virus Genes, 39: 94-101.

4- Boroomand,M., Jafari, R.A., Mayahi, M.(2016). Molecular characterization and phylogenetic study of the fusion genes of Newcastle disease virus from the recent outbreaks in Ahvaz, Iran, Virus-Dis. (January–March 2016) 27(1):102–105.

5- Diel, D.G., Dasilva, L.H., Liu, H., Wang, Z., Miller, P.J., Afonso, C.L. (2012). Genetic diversity of avianparamyxovirus type1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. Infection, Genetics and Evolution, 12: 1770–1779.

6- Ebrahimi, M. M., Shahsavandi, S.((2012)). Phylogeny and evolution of Newcastle disease virus genotypes isolated in asia during 2008-2011; Virus genes 45: 63-68.

7- Esmaelizad,M., Mayahi ,V., Pashaei,M., Goudarzi, H.(2016). Identification of novel Newcastle disease virus sub-genotype VII-(j) based on the fusion protein. Arch Virol, DOI 10.1007/s00705-016-3189-9.

8- Farooq, M., Saliha, U., (2014). Biological & genotypic characterization of Newcastle disease virus isolated from disease outbreaks in commercial poultry farms in northern Punjab, Pakistan.

Virology reports 3, 30-39.
9- Ganar, K., Das, M., . (2014). Newcastle disease virus: Current status and our understanding; viruse research 184,71-81.
10-Ghalyanchi,A.L., Hosseini, H., karimi, V.(2012). phylogenetic study base on matrix gene of Iranian Newcastle disease virus isolates, 2011-2012;comp Clin pathol .
11- Ghalyanchi, L.A., Hosseini, H., Karimi, V.(2014). Phylogenetic study based on the phosphoprotein gene of Iranian Newcastle disease viruses (NDV) isolates, 2010- 2012; *Iranian Journal of veterinary medicine*, 8(2):73-77.
12-Giovanni, C., Susta, L.,. (2011) . Newcastle disease: a review of field recognition & current methods of laboratory detection. *Journal of Veretinary Diagnostic Investigation* 23(4)637-656.
13-Gould, A.R., Kattenbelt, J.A., Selleck, P., Hansson, E., Della-Porta, P.A., Westbury, H.A. (2001). Virulent Newcastle in Australia: Molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. Virus Research, 77: 51-60.
14-Hossenii, H., Ghalyanchi, A. L, Torai, R. (2014). Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease Viruses isolated in Iran, 2010-2012; Avian disease 58: 373-376.
15-Khan, S.T., Rehmani, Rue, C., Miller, P., Afonso, C.L.(2010). Phylogenetic and pathological characterization of Newcastle disease virus isolates from Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 1892-1894.
16-Kianizadeh, M., Aini, I., Omar, A.R., Yusoff, K., Sahrabadi, M., Kargar, R. (2002). Sequence and phylogenetic analysis of the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus field isolates from Iran. Acta Virologica 46: 247-251.
17- Kianizadeh, M.,, lderis , A., Shahrabadi, M.S., Kargar, R. (1999). Biological and Molecular Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Iran; Arch.RaZ; lns. 50.
18-Kiril, M. D., Claudio, L. A.(2016). Newcastle disease vaccines_ A solved problem or a continuous challenge? Veterinary Microbiology 7477 No pages 11.
19- Maclachlan, N. J., Dubove, E. J.(2011). Book,Fenner's veterinary Virology, 4th edition,,chapter 17 p.p310-315.
20-Mayahi, M. Boroomand, Z . (2016) . Study on experimental infection of Newcastle disease virus in local breeder chicks infected with infectious bursal disease virus; veterinary Researches & Biological products NO 117, pp:11-23.
21- Mayahi, V., Esmaelizad, M.(2017). Molecular evolution and epidemiological links study of Newcastle disease virus isolates from 1995 to 2016 in Iran. Arch Virol 162:3727–3743.
22- Merabanpour, M., khoobyar, S., Rahimian, A. (2014). Phylogenetic characterization of the fusions genes of the Newcastle disease viruses isolated in Fars province poultry farms during 2009-2011;Veterinary research fourm; 5(3)187-191.
23- Miller, P. J., Kin.g, D. J. (2007). Antigenic difference among Newcastle disease virus strains of defferent genotyping used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge .Vaccine 25, 7238-7246.
24-Miller, P.J., Kim, L.M., Ip. H.S., Afonso, C.L. (2009). Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. Virology, 391: 64-72.
25- Newcastle disease; The center for food security & public heath. (2016). www.cfsph.iastate.edu.
26-OIE Terrestrial Manual 2012,C H A P T E R 2. 3 . 1 4.NEWCASTLE DISEASE.
27- Panda, A., Huang, Z., Elankumaran ,S. (2004). Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus, Microbial Pathogenesis 36,1-10.
28-Samadi, S., Kianizadeh, M., Najafi, M.F., Nasab, S.D., Davatgar, A.M., Royaee, A., Pilvar, P. (2014). Molecular characterization and phylogenetic study of velogenic Newcastle disease virus isolates in Iran. Virus Genes, 48: 290-295.
29-Siddique, N., Naeem, K., (2013). sequence phylogenetic analysis of virulent Newcastle disease virus isolates from Pakistan during 2009-2013 reveals circulation of new sub genotype; virology 444,37-40.
30- Singh, K., Jindal, N., Gupta, S.L.(2005). Detection of Newcastle disease virus genome from the field outbreaks in poultry By Reverse Transcription- polymerase chain reaction; *International Journal of poultry Science* 4(7)472-475.
31-Solomon, P., Abolnik, C., Joannis, T.M., Bisschop, S. (2012). Virulent Newcastle disease virus in Nigeria: identification of a new clade of sublineage 5f from livebird markets. Virus Genes, 44: 98–103.
32- Uddin H., Islam K., Barua M., Islam S. and Ahad A. (2017) Characterization of hemagglutination activity of emerging Newcastle disease virus in Bangladesh. *International Journal of One Health*. EISSN: 2455-8931, Open Access.
33-Van Borm, S., Obishakin, E., Joannis, T. (2012). Further evidence for the widespread co-circulation of lineages 4b and 7 velogenic Newcastle disease viruses in rural Nigeria. Avian Pathology, 41: 377–382.
34- Wang, Y., Zang, H., Gu, C. (2018). phylogenetic and pathotypic characterization of a Newcastle disease virus strain isolated from Ducks and pigeons in Hubei, China; Brazilian journal of poultry science , v.20/n.1/145-152.
35- Xu, Q., Sun,J. and et al; Genetic antigenic, and pathogenic characteristics of Newcastle disease viruses isolated from geese in

38-FATHI E.A., POURBAKHSH S.A., JAFARIAN MOHSEN(2009) PHYLOGENIE ANALYSIS AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS IN FOWLS FORM IN CHAHARMAHAL-BAKHTIYARI PROVINCE, SCIENTIFIC-RESEARCH IRANIAN VETERINARY JOURNAL , Volume 5 , Number 2 (23); Page(s) 50 To 55.

39-Statistics of Iran Statistics Center 1394, Management and Planning Organization, statistics of broiler farming statistics,page 22-28

china. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 1-10.

36- Yune, N., Abdela, N.(2017). update on epidemiology, Diagnosis & control technique of Newcastle disease, *Journal of veterinary science & technology*,8:2.

37-Setareh Khoobyar, Mohammad Bagher Nazari, Abdollah Rahimian, Mohammad Javad Mehrabanpour(2011) Isolation and pathotyping of Newcastle viruses by RT-PCR and MDT methods from broiler chickens in Fars province, Journal of Microbial WorldVolume 4, No. 1 & 2.