JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره هفدهم، شماره اول، ۱۴۰۰، پیاپی ۴۲: ۲۲-۱۳

مقاله پژوهشی

# تعیین هویت مولکولی ویروس نیوکاسل در سندروم تنفسی گله های گوشتی استان اصفهان

**گیتا جنگجوی لوحه سرایی [۱]، جلال شایق [۲*]**

۱- دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی،گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

۲- استادیار بخش میکروب شناسی گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

**چکیده**

ویروس بیماری نیوکاسل در ایران بومی بوده و باوجود برنامه واکسیناسیون منظم رخدادهای چندی از آن گزارش می‌شود. با توجه به تنوع ژنوتیپی ویروس نیوکاسل در مناطق مختلف جغرافیایی لزوم مطالعه و تعیین ژنوتیپ‌های هر منطقه ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه به‌منظور تعیین حضور ژنوتیپ‌های مختلف ویروس نیوکاسل در جمعیت طیور آن طراحی‌شده است. بدین منظور هشت شهرستان از استان اصفهان تعیین و از ۳۴ گله گوشتی نمونه اخذ گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به منظور تعیین توالی ویروس بیماری نیوکاسل بر مبنای تشخیص حضور پروتئین f انجام شد. سپس ۵ نمونه از نمونه‌ها تعیین توالی شده و نتایج تعیین توالی و درخت فیلوژنی ویروس‌های رسم گردید. نتایج حاصل تعلق ۲ نمونه تعیین توالی شده به ژنوتیپ VII و تحت ژنوتیپ VII l نشان می‌دهد. ۳ نمونه دیگر جزو ژنوتیپ II می‌باشند که با توجه به حضور سویه واکسینال لاسوتا نیوکاسل در آن احتمالاً ارتباطی با آن دارند. نتایج حاصله در این مطالعه ضمن تائید حضور ژنوتیپ VIIIدر سندرم تنفسی به حضور ویروس‌های واکسینال در موار د سندرم تنفسی اشاره دارد به دلیل شیوع سندرم تنفسی در کشور مطالعاتی ازاین‌دست می‌تواند در گزارش موارد جدید و نیز نقش سویه‌های واکسینال در سندرم را بیشتر آشکار نماید.

**کلمات کلیدی: ویروس نیوکاسل، تنوع ژنتیکی، سندروم تنفسی،گله های گوشتی**

*نویسنده مسئول: جلال شایق

آدرس: شبستر دانشگاه آزاد اسلامی واحدشبستر، گروه دامپزشکی، صندوق پستی ۱۵۹-۵۳۸۱۵

پست الکترونیک : jalalshayegh@gmail.com

**مقدمه**

بیماری نیوکاسل نوعی بیماری ویروسی است که توسط تیپ ۱ پارامیکسو ویروس‌های پرندگان (APMV-1) ایجاد می‌شود (۳). این ویروس اولین بار در سال ۱۹۲۶ به‌وسیله‌ی کرانولد در جاوه و سپس توسط دوبل در نیوکاسل انگلستان مشاهده گردید(۲). عامل بیماری متعلق به جنس avulavirusخانواده paramyxovirdaeمی‌باشد. پارامیکسو ویریده تیپ ۱، ویروسی RNAدار، تک‌رشته‌ای با قطبیت منفی است که ۱۳ سروتیپ جدید را شامل می‌شود. ۶ پروتئین N,HN,F,M,P توسط ژنوم ویروس مذکور کد می‌گردد. بیماری حاصل دارای گسترش جهانی در میان پرندگان اهلی و وحشی است (۱۱). بیماری‌زایی این ویروس بر اساس سکانس آمینه اسید در ناحیه شکست پروتئین F است. آنالیز سکانس نوکلئوتیدی ژن فیوژن به‌ویژه در این منطقه از ژن در پیشگویی بیماری‌زا بودن این ویروس نقش مهمی دارد. بر همین اساس ویروس نیوکاسل به دو کلاس ۱ و ۲ تقسیم می‌گردد کلاس ۱ شامل ۱ ژنوتیپ و ۳ تحت ژنوتیپ بوده و اکثراً ژنوتیپ‌های با حدت پایین را دربر می‌گیرند. کلاس ۲ شامل ۱۸ ژنوتیپ می‌شود که اکثر سویه‌های بیماری‌زا یا ولوژنیک ویروس در آن قرار می‌گیرند(۴)

ویروس بیماری نیوکاسل در ایران بومی بوده و باوجود برنامه واکسیناسیون منظم باز رخدادهای چندی از آن گزارش می‌شود (۷). تنوع ژنوتیپی احتمالاً موجب می‌شود که باوجود تیتر بالای آنتی‌بادی در اثر واکسیناسیون در گله‌ها پوشش ایمنی لازم برای پیشگیری از وقوع بیماری حاصل نگردد. احتمالاً ایمنی ایجادشده توسط سویه‌های واکسینال پوشش لازم جهت مصون نگه‌داشتن طیور در ابتلا به سویه‌های بومی را ندارند (۵) با توجه به تنوع ژنوتیپی ویروس نیوکاسل در مناطق مختلف جغرافیایی لزوم مطالعه و تعیین ژنوتیپ‌های هر منطقه ضروری به نظر می‌رسد(۴). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص حضور ژنوتیپ‌های مختلف در ایران انجام‌شده است که برخی به گزارش ژنوتیپ جدیدی منجر شده است(۱۲) همین امر لزوم پایش منظم ویروس را در مناطق مختلف جغرافیایی و در فواصل مختلف زمانی اجتناب‌ناپذیر می‌کند(۱۳). ازآنجای که اصفهان جز استان‌های مهم ازنظر صنعت طیور در ایران است، این مطالعه به‌منظور تعیین حضور ژنوتیپ‌های مختلف ویروس نیوکاسل در جمعیت طیور آن طراحی‌شده است. نتایج این مطالعه می‌تواند در شفاف شدن مسیر در اخذ تدابیر کنترلی برای بیماری نیوکاسل در ایران راه گشا باشد.

## مواد و روش کار

### نمونه‌برداری:

در این مطالعه نمونه‌برداری به روش نمونه‌برداری تصادفی- خوشه‌ای انجام شد. به این ترتیب که ابتدا از میان شهرستان‌های استان اصفهان، هشت شهرستان تعیین و سپس به تناسب از ۳۴ گله گوشتی استان با استفاده از سواپ نای/شکاف کامی از پرندگان مشکوک به بیماری‌های تنفسی واجد علائم سندروم تنفسی نظیر عطسه، سرفه، رال‌های تنفسی و آبریزش از چشم و بینی به همراه انسداد مجاری تنفسی و تورم سینوس‌ها نمونه برداری شد. برای هر مرغداری پرسشنامه‌ها حاوی سؤالاتی نظیر آدرس، ظرفیت مرغداری، تعداد سالن، سن، تعداد تلفات در روز، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک تهیه و تکمیل گردید.

### استخراج RNA:

سوآپ‌های جمع‌آوری‌شده به‌صورت دسته‌های دو یا سه‌تایی در مایع PBS قرار قرارگرفته و پس از ورتکس میزان ۵۰۰ میکرو لیتر از مایع مذکور به یک میکرو

تیوپ منتقل شد. استخراج RNA با استفاده از کیت (CinnaGen, Iran) و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. درمجموع ۲۰۷ سوآپ نای در قالب ۶۹ نمونه دو یا سه تایی استخراج شد. جهت سنتز cDNA از کیت شرکت Revert aid first stand cDNA Synthesis kit (Teremo, Canada) بر طبق دستورالعمل شرکت سازند استفاده شد. پس از استخراج RNA جهت سنتز cDNA از آغازگر تصادفی استفاده گردید؛ و cDNA ساخته‌شده به‌عنوان الگو برای PCR مورداستفاده قرار گرفت.

## انجام PCR به‌منظور تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به منظور تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل بر مبنای تشخیص حضور پروتئین F اختصاصی در حجم ۵۰ میکرو لیتر، شامل PCR Buffer(10x)(5)، dNTP(10mM)، Taq DNA polymerase (5U/ µl)، MgC12 (50mM)، پرایمرهای اختصاصی ۰/۵ میکرومولار (جدول ۱) و DNA استخراج‌شده شامل ۱ میکرو لیتر (۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. واکنش زنجیره پلیمرازی مطابق جدول ۲ انجام شد. محصولات حاصله در آگارز ۱٪ الکتروفورز و با استفاده از ژل داکیومنت عکس‌برداری انجام گرفت (8).

**جدول ۱: برنامه دمایی واکنش PCR برای تشخیص ژن مولد پروتئین F ویروس نیوکاسل**

| واسرشت اولیه | | واسرشت | | اتصال | | طویل شدن | | طویل شدن نهایی | | تعداد سیکل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| دما | زمان | دما | زمان | دما | زمان | دما | زمان | دما | زمان | |
| ۹۴ | ۳ | ۹۵ | ۳۰ | ۵۳ | ۳۰ | ۷۲ | ۶۰ | ۷۲ | ۱۵ | ۳۵ |

**جدول ۲: پرایمرهای مورداستفاده در واکنش PCR تشخیص حضور پروتئین F برای تشخیص ژن مولد پروتئین F ویروس نیوکاسل**

| رفرانس | اندازه باند | سکانس | نام پرایمر | میکرو ارگانیسم | نام ژن |
|---|---|---|---|---|---|
| Kant et al. (1997) | bp ۳۶۲ | 5'-TTGATGGCAGGCCTCTTGC-3' | A(فوروارد) | ویروس بیماری نیوکاسل | F |
| | | 5'-GGAGGATGTTGGCAGCATT-3' | B(ریورس) | | F |

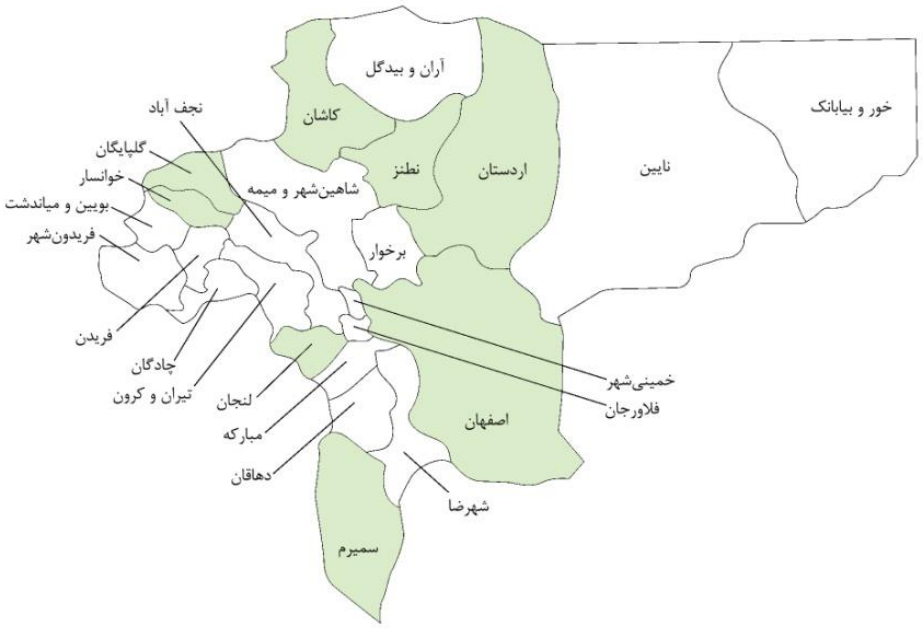
## تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیک:

محصول PCR برای تعیین توالی به کشور کره جنوبی ارسال شد (Bioneer, South Korea). نتایج تعیین توالی ویرایش شده و درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار با استفاده از روش NJ رسم گردید (۱۴). از توالی ژنی ثبت شده مربوط به ژن F ویروس نیوکاسل در بانک ژنی جهت رسم درختچه و تکمیل آن استفاده شد.

## نتایج

### ۱- نمونه‌ها:

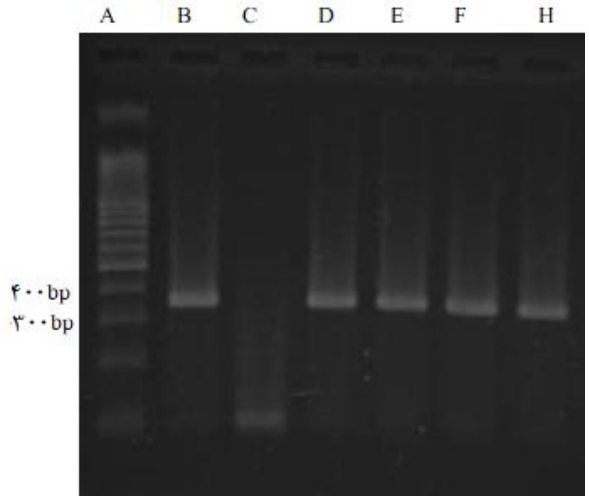
در این مطالعه تعداد ۲۰۷ سواپ نای/شکاف کامی از ۳۴ گله گوشتی از هشت شهرستان استان اصفهان که مشکوک به بیماری‌های تنفسی اخذ شد درنهایت از هر گله حداقل ۵ نمونه اخذ گردید و نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به آزمایشگاه ارسال گردید. شهرستان‌های نمونه‌برداری شده در شکل (۱) بارنگ تیره مشخص‌شده است.




**شکل ۱- شهرستان نمونه‌برداری شده جهت مطالعه**

## تعیین حضور ویروس با استفاده از PCR:

نتایج حاصل از PCR حضور ویروس نیوکاسل با استفاده از روش PCR طراحی‌شده توسط Kant و هم کاران (۱۹۹۷) به انجام رسید. در این روش از پرایمر اختصاصی استفاده‌شده حضور باند DNA به‌اندازه 362 جفت باز به‌عنوان حضور ویروس نیوکاسل معرفی می‌شود(شکل ۲).




**شکل۲- تصویر ژی الکترفورز مربوط به ویروس نیوکاسل(ژن F): ستون A مارکر (۱۰۰bp)، ستون B،D تا H نمونه مثبت و ستون Cنمونه منفی.**

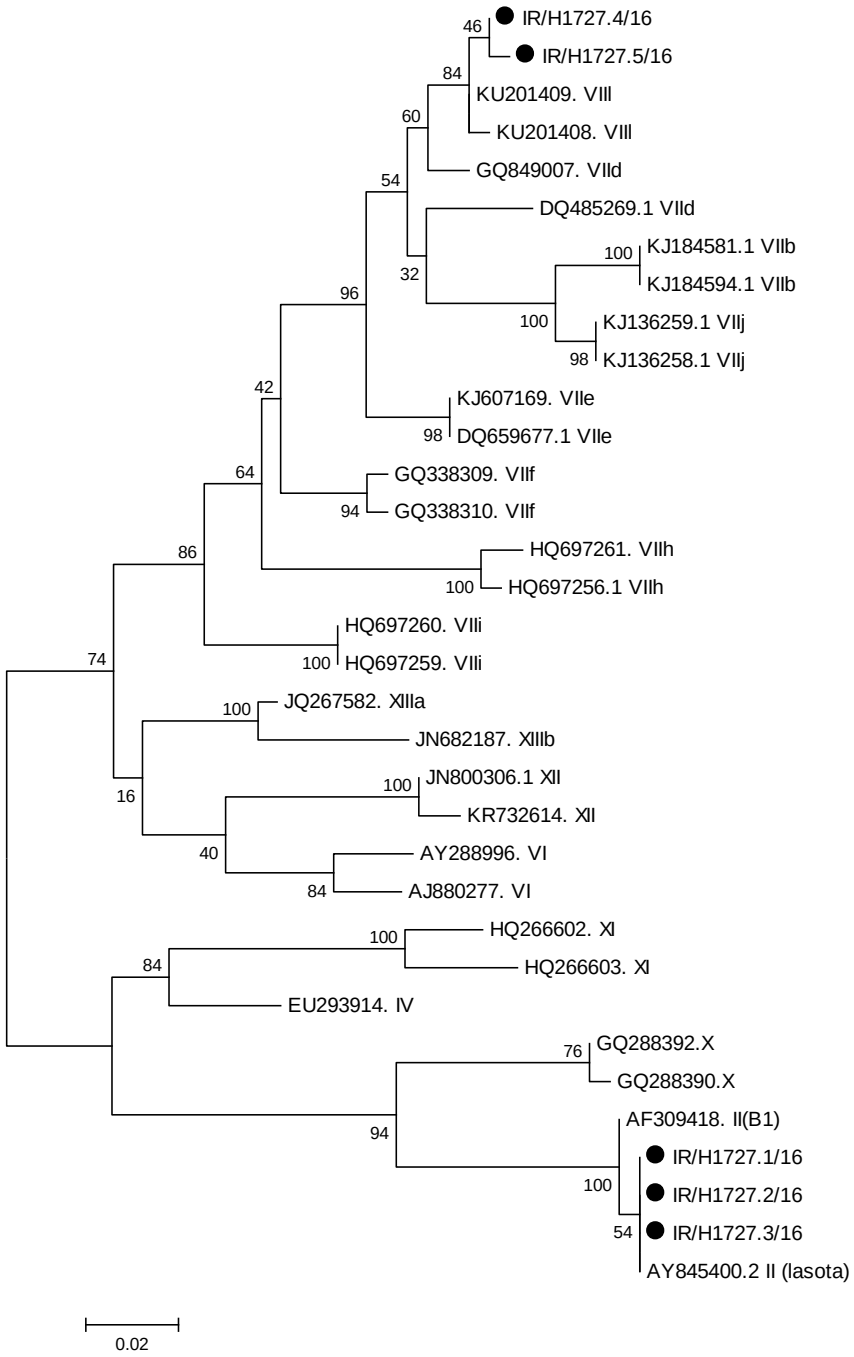
بر اساس نتایج حاصله از ۳۴ گله نمونه‌برداری شده، ۲۲ گله (۶۱٪) ازنظر ویروس نیوکاسل مثبت بودند و تنها ۱۲ گله (۳۹٪) منفی بودند. همچنین از ۶۹ نمونه ارجاع داده‌شده به آزمایشگاه ۵۱ درصد)۳۵ نمونه (از نمونه‌ها مثبت و فقط ۴۹ درصد)۳۴ نمونه منفی بودند (جدول ۳).

جدول شماره ۳- پراکندگی نمونه‌های مثبت در سطح شهرستان‌های استان اصفهان

| شهرستان | فارم مثبت | کل فارم | نمونه مثبت | کل نمونه |
|---|---|---|---|---|
| اردستان | ۲ | ۶ | ۴ | ۱۱ |
| اصفهان | ۵ | ۱۰ | ۹ | ۲۰ |
| خوانسار | ۱ | ۳ | ۱ | ٦ |
| سمیرم | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| کاشان | ۷ | ۷ | ۹ | ۱۳ |
| گلپایگان | ۳ | ۴ | ۴ | ۸ |
| لنجان | ۱ | ۱ | ۲ | ۲ |
| نطنز | ۲ | ۴ | ۳ | ۸ |

## ۲- تجزیه‌وتحلیل روابط فیلوژنتیک جدایه‌ها:

بررسی فیلوژنتیک روابط بین ۵ ویروس تعیین توالی شده با استفاده از نرم‌افزار Meg.6 مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا توالی‌های موردنظر در نرم‌افزار CLUSTALX نمونه‌ها مورد Alinment قرارگرفته و درنهایت درختچه‌های فیلوژنی به‌صورت درختچه joining neighbour- رسم گردید.




**شکل۳- درختچه فیلوژنتیک بر اساس توالی ژن F رسم شده توسط برنامه Mega6**

تعداد ۵ نمونه از نمونه‌های مثبت گزارش‌شده‌ی شهرستان‌های اصفهان، اردستان، کاشان و نطنز مورد توالی یابی قرار گرفتند که نتایج حاصل تعلق ۲ نمونه تعیین توالی شده به ژنوتیپ VII و تحت ژنوتیپ VIII نشان می‌دهد. ۳ نمونه دیگر جزو ژنوتیپ II می‌باشند .

## بحث:

بیماری نیوکاسل یکی از بیماری‌های مهم بومی‌شده در ایران است که سال‌ها علیه واکسیناسیون انجام می‌گیرند(۹). سویه‌های متفاوتی از این بیماری در مرغداری‌های ایران گزارش شدند که موجب این تلفات شدید در مرغداری‌ها می‌شوند(۷) بررسی حاضر

نشـان از آن دارد کـه نیوکاسـل سـهم مهمـی در ایجـاد بیماری‌های مستقل و پونومونی‌های مخلوط دارد.

ویروس نیوکاسل دو روش تعیـین تنـوع ژنتیکـی جهـت مطالعـه فیلـوژنتیکی بـر پایـه پـروتئین NوF دارد از ایـن میان مطالعه فیلوژنتیکی بر پایه پروتئین F اهمیت زیـادی دارد. چراکه این ژن شامل توالی اسید امینـه ی -R-R-R Q-K-R است که در توجیه حاد بودن و یـا حـاد نبـودن ویروس نقش اساسی دارد، به طوری کـه تغییـر در ایـن توالی اثرات بارزی بر روی حدت و فعالیت بیولـوژیکی ویروس دارد. بر همـین پایـه ویـروس نیوکاسـل بـه دو کلاس I و II تقسیم بندی میشود که ویروسهای موجـود در کـلاس I اهمیـت بـالینی ندارنـد. امـا در مقابـل ویروسهای متعلق به کلاس II عـلاوه بـر اهمیـت بـالینی تنوع در ناحیه مذکور نشان داده و به ژنوتیـپ هـایی از I تا XVIII تقسیم بندی می شوند.

برخی از این ژنوتیپ هـا اهمیـت بیمـاری زایـی خاصـی ندارند. برای مثال ژنوتیپ II فاقد حـدت بـوده و برخـی سـویه هـای ان مـدت هـا اسـت بـه عنـوان سـویه هـای واکسینال B1 و Lasota استفاده میشـوند. امـا در ایـن میان برخی از سـویه هـای دیگـر دارای حـدت فراوانـی میباشند از میان آنها سویه VII با تنوع بالایی کـه از نظـر تحت ژنوتیپی در ان مشخص شده است در خاورمیانـه و اسیا سبب بسیاری از بیماری های نیوکاسـل اسـت. ایـن سـویه بـرای اولـین بـار در اسـیای دور در سـال ۱۹۹۰ گزارش شده واز انجا به سایر مناطق اسیا اروپای جنـوبی و افریقا ی گسترش یافته است. اجـزای ایـن ژنوتیـپ بـه تحت ژنوتیپ های متعددی تفسیم مـی شـوند.اکثر ایـن ژنوتیپ ها دارای خصوصیات بیماری زایی و ولوژنیـک هستند. اخیرا ژنوتیپ VII d گسترش جهانی پیدا کـرده است(۱).

تـاکنون در ایـران سـویه هـای VIIb و VIId در طیـو ر گزارش شده است از سوی دیگر VIIi در سال ۲۰۱۸ از پرندگان مهاجر مبتلا در ایران گزارش شد (۵). همچنین تنها مطالعه موجود در خصوص پرندگان وحشی مهـاجر در ایران نشـان از وجـود ژنوتیـپ جدیـد VII l در میـان انها دارد (۱۳). اما گزارشی در خصـوص VIIIdر میـان طیور پرورشی وجود ندارد. در مطالعه حاضـر مطالعـات فیلوژنیک نشان از حضـور ایـن تحـت ژنوتیـپ در میـان جدایه های جدا شده در مطالعات حاضر دارد که به نظر میرسد این سویه در گردش در میـان جمعیـت طیـور در ایران و یا حداقل در اسـتان اصـفهان مـی باشـد. احتمـال دارد طیور سنتی دارای پتانسیل لازم جهت انتقـال آن بـه طیور صنعتی است. به نظر می رسد با عدم رعایت کامل اصول حفاظت زیستی طیور بومی می‌تواند این ویـروس را به طیور صنعتی انتقال دهنـد بنـابراین پیشـنهاد بـر ایـن است که ضمن بررسی و کنترل ویروس در طیور بـومی ازطریق معدوم سازی موارد ابتلا توصیه اکید بر رعایـت اصـــول حفاظـــت زیســـتی در طیـــور صـــنعتی را نمود.(۱۳و۱۰).

در ایـن مطالعـه در کنـار ژنوتیـپ VII l ، سـه ویـروس تـوالی یـابی شـده متعلـق بـه ژنوتیـپ II و سـویه‌هـای واکسینال هست . به نظر می‌رسد که گـردش سـویه‌هـای زنده واکسینال ویروس خود در پیچیده کـردن مـوارد و سندرم تنفسی و طیور نقش داشته باشند(۶) اگرچه تائیـد چنین موضوعی نیاز به مدارک و شواهد دیگـر دارد امـا حضور سویه‌های واکسینال زنده در سندرم تنفسـی چنـد عامل یکـی از مـوارد ضـروری جهـت مطالعـه در طیـور اسـت اگرچـه بسـیاری از از محققـین اعتقاددارنـد کـه واکسن‌های لاسوتا و واکسن‌های H1 در کنترل بیمـاری و یا کنترل سویه‌ها نقـش نداشـته باشـند ولـی اسـتفاده از

واکسن‌های دیگر یا تولید واکسن‌های دیگر هم با ریسک توام هست .

برخی از ژنوتیپ‌های نیوکاسل که بدین روش تعیین تیپ شده‌اند. نقش بارزی در ایجاد بیماری دارند در مطالعه حاضر دو ژنوتیپ II و VIIl از موارد سندوم-های تنفسی استان اصفهان جداشده است. ژنوتیپ VII یکی از ژنوتیپ‌های ولوژنیک نیوکاسل است که در خاورمیانه تلفات فراوان را موجب می‌شوند. این سویه برای اولین بار در تایوان شناسایی و سپس از مناطق مختلف گزارش گردید اخیراً در ایران نیز چهار تحت تیپ VIIi،VIIbVIId و VIIl از این ژنوتیپ گزارش‌شده‌اند تحقیقات نشان می‌دهد که این ژنوتیپ نقش عمده‌ای در تلفات ایجادشده توسط نیوکاسل در ایران دارند چراکه واکسیناسیون نیوکاسل در ایران پیش‌تر به‌واسطه تیپ II انجام می‌گیرند(۵). تحت تیپ VIIl اخیراً به عنوان تحت تیپ جدید از ایران گزارش شده است. این جدایه را از طیور بومی جدا کرده و ذکر می‌نمایند که این پرندگان می‌توانند به‌عنوان مخزنی برای انتقال بیماری به طیور پرورشی باشند(۱۳). این گزارش اولین گزارش این تحت تیپ در طیور پرورشی در ایران است که از موارد سندروم تنفسی جدا شده است. وضعیتی مشابه در چین در خصوص این سروتیپ برقرار است . بدین ترتیب که تحت تیپ VIIl مخصوص طیور دریایی بوده و از آن طریق به طیور صنعتی انتقال می‌یابد(۱۳).

لزوم مطالعه‌های مختلف در مناطق مختلف بارها مورد تأکید بوده است(۱۰) بنابراین مطالعات در اصفهان نیز وجود ژنوتیپ VII را مورد تائید می‌کند در کنار ژنوتیپ II که مربوط به سویه‌های واکسینال هست نیز در طیور مبتلابه سندرم تنفسی در این مطالعه جداشده‌اند . به نظر می‌رسد که گردش سویه‌های زنده واکسینال ویروس خود در پیچیده کردن موارد و سندرم تنفسی و طیور نقش داشته باشند(۶) اگرچه تائید چنین موضوعی نیاز به مدارک و شواهد دیگر دارد اما حضور سویه‌های واکسینال زنده در سندرم تنفسی چند عامل یکی از موارد ضروری جهت مطالعه در طیور است .

## نتیجه گیری

نتایج حاصله در این مطالعه ضمن تائید ژنوتیپ VII در سندرم تنفسی به حضور ویروس‌های واکسینال در موارد سندروم تنفسی اشاره دارد به دلیل احتمال حضور ژنوتیپ‌های جدید مطالعاتی ازاین‌دست می‌تواند در گزارش موارد جدید و نیز نقش سویه‌های واکسینال در سندرم را بیشتر آشکار نماید.

## تشکر و قدردانی:

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه نویسنده اول می‌باشد. از حوزه پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

1) Aldous, E.W., J. K. Mynn, J. Banks, and D. J. Alexander. (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 Pathology* **32**:237–55.
2) Alexander, Dennis J. (2012). *Newcastle Disease*. Vol. 8. Springer Science & Business Media.
3) Awan, Manzoor Ahmed, M. J. Otte, and A. D. James. (1994). "The Epidemiology of Newcastle Disease in Rural Poultry: A Review." *Avian Pathology* **23:**405–23.
4) Dimitrov, Kiril M., Andrew M. Ramey, Xueting Qiu, Justin Bahl, and Claudio L. Afonso. (2016). "Temporal, Geographic, and Host Distribution of Avian Paramyxovirus 1 (Newcastle

Disease Virus)." *Infection, Genetics and Evolution* **39**:22–34.

5) Ghalyanchilangeroudi, Arash, Hossein Hosseini, Masoumeh Jabbarifakhr, Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi, Hamideh Najafi, Seyed Ali Ghafouri, Fatemeh Sadat Mousavi, Zahra Ziafati, and Amir Modiri. (2018). "Emergence of a Virulent Genotype VIIi of Newcastle Disease Virus in Iran." *Avian Pathology* **47**:509–19.
6) Haji-Abdolvahab, Habibbolah, Arah Ghalyanchilangeroudi, Alireza Bahonar, Seyed Ali Ghafouri, Mehdi Vasfi Marandi, Mohammad Hosein Fallah Mehrabadi, and Farshad Tehrani. (2018). "Prevalence of Avian Influenza, Newcastle Disease, and Infectious Bronchitis Viruses in Broiler Flocks Infected with Multifactorial Respiratory Diseases in Iran, 2015--2016." *Tropical Animal Health and Production* 1–7.
7) Hosseini, Hossein, Arash Ghalyanchi Langeroudi, and Reza Torabi. (2014). "Molecular Characterization and Phylogenetic Study of Newcastle Disease Viruses Isolated in Iran, 2010-2012." *Avian Diseases* **58**:373–76.
8) Kant, A., G. Koch, D. J. Van Roozelaar, F. Balk, and A. Ter Huurne. (1997). "Differentiation of Virulent and Non-Virulent Strains of Newcastle Disease Virus within 24 Hours by Polymerase Chain Reaction." *Avian Pathology* **26**:837–49.
9) Kianizadeh, M., A. Ideris, A. R. Omar, K. Yusoff, M. S. Shahrabadi, R. Kargar, and S. A. POURBAKHSH. (1999). "Biological and Molecular Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Iran." *Archives of Razi Institute* **50**:1-9
10) Lomniczi, B., E. Wehmann, J. Herczeg, A. Ballagi-Pordany, E. F. Kaleta, O. Werner, G. Meulemans, P. H. Jorgensen, A. P. Mante, A. L. J. Gielkens, and others. (1998). "Newcastle Disease Outbreaks in Recent Years in Western Europe Were Caused by an Old (VI) and a Novel Genotype (VII)." *Archives of Virology* **143**:49–64.
11) Miller, Patti J., Ruth Haddas, Luba Simanov, Avishay Lublin, Shafqat Fatima Rehmani, Abdul Wajid, Tasra Bibi, Taseer Ahmad Khan, Tahir Yaqub, Surachmi Setiyaningsih, and others. (2015). "Identification of New Sub-Genotypes of Virulent Newcastle Disease Virus with Potential Panzootic Features." *Infection, Genetics and Evolution* **29**:216–29.
12) Rezaeianzadeh, Ghasem, Habibolah Dadras, Ali Safar Maken Ali, and Mohammad Hossein Nazemshirazi. (2011). "Serological and Molecular Study of Newcastle Disease Virus Circulating in Village Chickens of Fars Province, Iran." *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* **3**:105–11.
13) Sabouri, Fereshteh, Mehdi Vasfi Marandi, and Mohsen Bashashati. (2018). "Characterization of a Novel VIIl Sub-Genotype of Newcastle Disease Virus Circulating in Iran." *Avian Pathology* **47**:90–99.
14) Tamura, Koichiro, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski, and Sudhir Kumar. (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0." *Molecular Biology and Evolution* **30**:2725–29.