JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH
دوره نهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

ارزیابی فارمی واکسن زنده متاپنوموویروس پرندگان در مزرعه جوجه گوشتی

پیام حقیقی خوشخو[۱*]، حسین حسینی[۱]، گیتا اکبری آزاد[۱]، امیر بخشی[۲]

۱- گروه علوم درمانگاهی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۲- دانش آموخته واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

**** نویسنده مسئول: pkhoshkho@kiau.ac.ir***

دریافت مقاله: ۱آذر ماه۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۳اردیبهشت ماه۱۳۹۷

چکیده:

متاپنوموویروس پرندگان قادر به ایجاد عفونت حاد و مسری قسمت فوقانی دستگاه تنفس در ماکیان و بوقلمون است. از راههای کنترل بیماری، استفاده از واکسن می باشد. هدف این مطالعه، ارزیابی کارایی یک نوع واکسن زنده پنوموویروس در یک مرغداری جوجه گوشتی بود. در یک مرغداری جوجه گوشتی با سابقه درگیری به پنوموویروس، واکسن پنوموویروس در ۱۴ روزگی به روش قطره چشمی به گروه آزمایش تجویز شد. شاخص های پرورشی بصورت هفتگی تا آخر دوره پرورش (۴۲ روزگی) برای گروههای آزمایش و کنترل منفی محاسبه شد. هم چنین در روزهای ۱ و۱۴، ۲۸ و۴۲ روزگی، تیتر آنتی بادی علیه پنوموویروس و برونشیت عفونی با روش الایزا و علیه نیوکاسل و آنفلونزا با روش HI اندازه گیری شد. مقایسه نتایج آماری به روش Mann-Whitney در دو گروه نشان داد که شاخص های پرورشی (درصد تلفات، میانگین وزن، ضریب تبدیل غذایی و شاخص کارایی اروپایی) بصورت هفتگی، در گروه های آزمایش و کنترل منفی فاقد اختلاف معنی دار می باشند ($P>۰/۰۵$). گرچه مقایسه عددی دو گروه، تلفات کمتر و میانگین وزن بالاتر را در گروه آزمایش نشان داد. همچنین مقایسه آماری تیتر های آنتی بادی و ضریب تغییرات هر دو گروه برای آنتی‌بادی علیه پنوموویروس و هم چنین برای نیوکاسل، برونشیت عفونی و آنفلونزا اختلاف معنی داری را نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). پایین بودن تیترهای آنتی بادی ناشی از واکسن در این مطالعه تایید می کند که ایمنی هومورال متعاقب یک نوبت واکسیناسیون زنده پنوموویروس ضعیف بوده و حداقل در گله های گوشتی یا در مدت زمان کم بعد از تجویز، افزایش چندانی ندارد و ردیابی آن توسط آزمونهای سرولوژیک ارزش تشخیصی و تاییدی برای صحت واکسیناسیون ندارد.

کلمات کلیدی: ارزیابی فارمی، متاپنوموویروس، جوجه گوشتی، واکسن.

مقدمه:

در حال حاضر یکی از معضلات صنعت طیور، وقوع بیماری کمپلکس تنفسی در واحدهای پرورش طیور است. عوامل متعدد ویروسی، باکتریایی یا مدیریتی در بروز و تشدید این بیماری نقش دارند. یکی از ویروسهایی که احتمال حضور آن در بروز یا تشدید بیماریهای تنفسی می باشد، متاپنومووویروس (= پنومووویروس) پرندگان است. پنومووویروس پرندگان متعلق به خانواده پارامیکسوویریده و جنس متاپنومووویروس است. درگیری و ابتلا با این ویروس را می توان در میان ماکیان و بوقلمونها مشاهده نمود. بیماری باعث عفونت حاد و مسری قسمت فوقانی دستگاه تنفس در گله های طیور می شود . این ویروس می تواند باعث خسارات قابل توجه اقتصادی بخصوص در ترکیب با سایر پاتوژن ها شود. از ابزار های مطرح برای کنترل بیماری، استفاده از واکسن زنده آن می باشد که بنظر می رسد بطور مستقیم و غیر مستقیم باعث بهبود راندمان های پرورشی شود (Mundt, 2013).

واکسن زنده و کشته متاپنومووویروس هم اکنون در برخی از کشورهای اروپایی و آمریکایی استفاده می شود و مطالعات متعددی در این زمینه دردسترس است (Cook et al 1989a; Cook et al., 1989b; Mundt, 2013; Patnayak et al., 2011). سابقه ای از آزمایش فارمی واکسن زنده در سطح مزارع جوجه گوشتی در ایران وجود ندارد و مطالعات بیشتری می طلبد تا ضرورت تجویز آن در سطح این مزارع مشخص شود. اما از واکسن کشته و زنده آن در برخی از مزارع مادر گوشتی کشور هم اکنون استفاده می شود. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی کارایی یک نوع واکسن زنده پنومووویروس در کنترل بیماری ناشی از پنومووویروس در یک مرغداری گوشتی است.

مواد و روش ها

در یک مزرعه صنعتی جوجه گوشتی با شرایط مشابه پرورشی، تغذیه‌ای و بهداشتی دو سالن با ظرفیت ۶۵۵۰ و ۶۴۸۰ قطعه به ترتیب به عنوان سالن‌های آزمایش و کنترل منفی انتخاب شد. به استثنای واکسن پنومووویروس، برنامه واکسیناسیون براساس شرایط منطقه بطور یکسان برای هر دو سالن طراحی و اجراء شد (جدول شماره۱). در سالن آزمایش واکسن زنده پنومووویروس در ۱۴ روزگی به روش قطره چشمی تجویز شد ولی سالن کنترل منفی این واکسن را دریافت نکرد. لازم بذکر است که این واکسن حاوی ویروس تخفیف حدت یافته رینوتراکئیت ماکیان، سویه ۱۰۶۲، تحت تیپB، با منشا ماکیان و به میزان حداقل $10^{2.4}$ $TCID_{50}$ می باشد و از سوی سازنده واکسن جهت پیشگیری از بیماری سندرم کله بادی(SHS) در گله های گوشتی، تخمگذار و مادر و رینوتراکئیت بوقلمون در گله های بوقلمون توصیه شده است. این واکسن دارای ایمنی متقاطع با تحت تیپ A نیز می باشد و قابل اجرا توسط روشهای مختلف واکسیناسیون شامل روش قطره بینی، قطره چشمی، اسپری با قطرات درشت و آب آشامیدنی است. شاخص های پرورشی (درصد تلفات، میانگین وزن، میانگین مصرف دان، ضریب تبدیل غذایی و شاخص کارایی اروپایی) بصورت هفتگی تا آخر دوره پرورش (۴۲ روزگی) برای گروه های آزمایش و کنترل منفی محاسبه و به روش آماری Mann-Whitney مقایسه شدند.

در روزهای ۱، ۱۴(قبل از تجویز واکسن پنومو- ویروس)، ۲۸ و ۴۲ پرورش ۲۰ نمونه خون از هر گروه جهت اندازه گیری تیتر آنتی بادی علیه پنومو – ویـروس و برونشیت عفـونی با روش الایـــزا با کیت (Biocheck Co., Netherland) ART و تیتر آنتی‌بادی علیه نیوکاسل و آنفلونزا با روش HI اخذ شد.

جدول ۱: برنامه واکسیناسیون در سالن های آزمایش و کنترل منفی

روز	نوع واکسن	نحوه تجویز	گروه آزمایش	گروه کنترل
۱	برونشیت عفونی(H_{120})	اسپری	+	+
۷	روغنی نیوکاسل + آنفلوانزا	تزریق زیر جلدی	+	+
۷	نیوکاسل(B_1)	قطره چشمی	+	+
۱۴	پنوموویروس	قطره چشمی	+	–
۱۷	گامبورو(D_{78})	آشامیدنی	+	+
۲۰	نیوکاسل (La Sota)	آشامیدنی	+	+
۲۳	گامبورو (D_{78})	آشامیدنی	+	+

یافته ها

راندمان های پرورشی (درصد تلفات، میانگین وزن، ضریب تبدیل غذایی و شاخص کارایی اروپایی) بصورت هفتگی تا آخر دوره پرورش (۴۲ روزگی) برای گروههای آزمایش و کنترل منفی در جدول ۲ آورده شده است. مقایسه آماری نشان داد که میانگین تلفات هفتگی، میانگین وزن، ضریب تبدیل غذایی و شاخص کارایی اروپایی در طول دوره بین دو گروه آزمایش فاقد اختلاف معنی دار می باشند (P> ۰/۰۵).

جدول ۲: میانگین تلفات تجمعی و میانگین وزن در دو گروه مورد بررسی

گروه / هفته	میانگین تلفات تجمعی		میانگین وزن		ضریب تبدیل غذایی		شاخص کارایی اروپایی	
	آزمایش	کنترل منفی	آزمایش	کنترل منفی	آزمایش	کنترل منفی	آزمایش	کنترل منفی
۱	۱/۲۷	۱/۲۵	۰/۸۸	۰/۸۹	۰/۸۸	۰/۸۹	۲۹۶/۵	۳۰۱/۲
۲	۱/۷۴	۱/۳۹	۱/۲۲	۱/۲۷	۱/۲۲	۱/۲۷	۲۴۷/۴	۲۲۷/۴
۳	۲/۲	۱/۸۵	۱/۳۷	۱/۲۳	۱/۳۷	۱/۲۳	۲۷۱/۹۵	۳۲۳
۴	۲/۴۳	۲/۲۲	۱/۴۲	۱/۴۴	۱/۴۲	۱/۴۴	۳۱۹	۲۹۸/۳
۵	۲/۵۵	۳/۲۴	۱/۶۷	۱/۵۷	۱/۶۷	۱/۵۷	۲۹۱/۸	۲۹۵/۹۵
۶	۲/۹۲	۳/۸	۱/۸۲	۱/۷	۱/۸۲	۱/۷	۲۸۵/۸	۲۹۹/۷

نتایج آزمایشات سرمی بین گروه آزمایش و کنترل در جداول ۳ تا ۵ آورده شده است. در مورد تیتر های پنومو‌ویروس، طبق تفسیر شرکت سازنده کیت ، سرم های با نسبت S/P > 0.50 (تیتر بالاتر از ۱۶۵۵) مثبت و پایین تر از آن منفی اعلام شده است. تعداد تیتر های مثبت و درصد آنها در ۲۰ نمونه سرم در هر مرحله در جدول شماره ۴ آورده شده است. در مورد تیتر های برونشیت عفونی، طبق تفسیر شرکت سازنده کیت ، سرم های با نسبت S/P > 0.20 (تیتر بالاتر از ۸۳۵) مثبت و پایین تر از آن منفی اعلام شده است. میانگین، ضریب تغییرات (CV %)، تعداد تیتر های مثبت و درصد آنها در ۲۰ نمونه سرم در هر مرحله برای پنومو-ویروس (جدول ۳) برونشیت عفونی (جدول ۴) ، نیوکاسل و آنفلوانزا (جدول ۵) آورده شده است. مقایسه آماری تیتر های آنتی بادی و ضریب تغییرات (CV) دو گروه به روش آماری Mann-Whitney در تمام جداول ۳ تا ۵ بین دو گروه اختلاف معنی داری نشان نمی دهد (P> ۰/۰۵).

جدول ۳: میانگین تیتر و CV% پنوموویروس به روش الایزا در دو گروه مورد بررسی.

گروه / روز	آزمایش			کنترل منفی		
	میانگین	تیتر های مثبت (٪)	CV %	میانگین	تیتر های مثبت (٪)	CV %
۱	۴۸۱	صفر	۴۶	۴۸۱	صفر	۴۶
۱۴	۴۸۴	صفر	۳۳	۲۳۷	صفر	۶۷
۲۸	۱۲۳	صفر	۸۵	۱۲۶	صفر	۷۸
۴۲	۶۷۰	۵	۶۲	۱۴۲۹	۳۰	۳۴

جدول ۴: میانگین تیتر و CV% برونشیت عفونی به روش الایزا در دو گروه مورد بررسی

گروه / روز	آزمایش			کنترل منفی		
	میانگین	تیتر های مثبت (٪)	CV %	میانگین	تیتر های مثبت (٪)	CV %
۱	۱۷۱۳	۱۰۰	۱۲	۱۷۱۳	۱۰۰	۱۲
۱۴	۱۷۶۵	۱۰۰	۹	۱۶۶۶	۱۰۰	۱۳
۲۸	۱۱۵۱	۷۵	۲۸	۱۲۳۲	۸۸	۲۷
۴۲	۵۷۳	۱۵	۸۱	۸۶۶	۳۵	۵۷

جدول ۵: میانگین تیتر و CV% نیوکاسل و انفلوانزا به روش HI در دو گروه مورد بررسی

گروه / روز	نیوکاسل				انفلوانزا			
	آزمایش		کنترل منفی		آزمایش		کنترل منفی	
	میانگین	CV%	میانگین	CV%	میانگین	CV%	میانگین	CV%
۱	۷/۷۵	۱۲	۷/۷۵	۱۲	۴	۳۸	۴	۳۸
۱۴	۵/۶۵	۲۷	۵	۲۶	۳/۸	۴۱	۲/۲۵	۳۸
۲۸	۱/۷۵	۳۳	۱/۲۵	۵۵	۱/۶۳	۵۰	۱/۶۳	۶۴
۴۲	۴/۳	۴۲	۵/۶۵	۲۶	۲/۵۵	۴۱	۲/۸	۵۴

بحث:

متاپنومو‌ویروس پرندگان (AMPV)اولین بار در اواخر دهه هفتاد میلادی در آفریقا شناسایی شد.(Buys et al., 1989) بیماری AMPV به تنهایی یا به کمک سایرپاتوژن ها و در حضور عوامل غیرعفونی مستعد کننده نظیر تراکم، سرما، سوء تغذیه، تهویه نامناسب و رطوبت پایین و غیره سبب افزایش خسارت در مزارع پرورش طیور می شود. ویروس دارای سه سروتیپ A، B و C است که کیت تجاری بکار رفته در این تحقیق قادر به اندازه گیری آنتی بادی علیه هر سه سروتیپ می باشد. در ایران نتایج متعددی از شیوع سرمی بیماری در مزارع بوقلمون گوشتی و ماکیان وجود دارد. به عنوان مثال رفیع پور در۴۴۰ نمونه سرمی از ۱۷ گله مرغ تخمگذار استان قم، ۹۲/۹ ٪ سرم ها را مثبت اعلام کرد (رفیع پور، ۱۳۹۰). جوکار از مجموع ۶۱۶ سرم نمونه مورد مطالعه از ۳۲ گله گوشتی تجاری، ۵۸/۸٪ مثبت اعلام کرد (جوکار، ۱۳۹۰). رحیمی در مطالعه ای در استان کرمانشاه نشان داد که ۱۰۰ ٪ گله های مرغ مادر و ۸۳/۳ ٪ گله های مرغ گوشتی مورد مطالعه، از نظر آنتی بادی متاپنومو‌ویروس پرندگان بوسیله آزمایش الایزا مثبت بودند.(Rahimi, 2011). حسینی و همکاران برای اولین بار تحت تیپ B پنومو‌ویروس پرندگان را به روش مولکولی از جوجه گوشتی جداسازی کردند (Hosseini and Ghalyanchi-Langeroudi, 2012). همایونفر و همکاران در ۸ گله از ۵۰ (۱۶ ٪) گله های طیور ژن G متاپنومو‌ویروس ها تحت تیپ B را شناسایی کردند (Homayounfar et al., 2013). واکسن زنده و کشته متاپنومو‌ویروس هم اکنون در برخی از کشورهای اروپایی و آمریکایی استفاده می شود، در ایران واکسن کشته و زنده در مزارع مادر گوشتی استفاده می شود (Mundt, 2013) ولی مصرف آن در سطح طیور گوشتی کشور در حال حاضر در حد مطالعه و بررسی مقدماتی است. گرچه شرکت های تولید کننده این واکسن، تجویز واکسن مذکور را در گله گوشتی، کاهش تلفات، افزایش وزن و بهبود ضریب تبدیل غذایی و در گله مادر، ضمن بی ضرری واکسن، باعث افزایش درصد جوجه درآوری، درصد

تولید تخم مرغ و درصد مرگ و میر دانسته اند. با اینحال مقالات متعددی در مورد نتایج واکسیناسیون از کشورهای مختلف در دسترس است. تخفیف حدت دادن پنوموویروس حاد پرندگان با تکرار پاساژ در کشت سلول قبلا گزارش شده است (Cook et al., 1989a; Gulati et al., 2001; Williams et al., 1991). ویروس زنده تخفیف حدت یافته به دلیل القای پاسخ ایمنی قوی و حفاظت خوبی که ایجاد می کند، نامزد خوبی برای واکسن است (Collins et al., 1999; Cook et al., 1996; Murphy et al., 1988). واکسن های تحت تیپ A در حفاظت در برابر عفونت تحت تیپ aMPV-B موثر است. همچنین برای تحت تیپ aMPV-C در آمریکا جایی که این تحت تیپ غالبا پیدا می شود واکسن هایی در دسترس است (Mundt, 2013).

یک گروه تحقیقاتی اعلام کردند که واکسیناسیون در گله بوقلمون باعث کاهش علایم بالینی و حفاظت پرنده شد گرچه پاسخ آنتی بادی ضعیفی را نشان داد (Patnayak et al., 2002). گزارشاتی مبنی بر تداخل این واکسن با واکسن های نیوکاسل و برونشیت عفونی وجود دارد. به عنوان در انگلیس تداخل واکسن برونشیت عفونی با تکثیر ویروس پنوموویروس و درنتیجه پاسخ آنتی بادی ضعیف پنوموویروس پرندگان نشان داده شد(Cook et al., 2010).

یک گروه تحقیقاتی انگلیسی نیز تداخل واکسن زنده پنوموویروس و واکسن زنده نیوکاسل وقتی همزمان تجویز می شوند را نشان دادند (Ganapathy et al., 2005). با اینحال محققینی دیگر مشاهده کردند که واکسن متاپنوموویروس اثری روی پاسخ سرولوژیکی واکسن های نیوکاسل و برونشیت عفونی ندارد (Tarpey et al., 2007). احتمال برگشت ویروس واکسن به شکل بیماری زا در بوقلمون هایی که دز کامل ویروس واکسن را دریافت نمی کنند گزارش شده است ولی تاکنون هیچ گزارشی در جوجه ها وجود ندارد(Banet-Noach et al., 2009; Jones et al., 1992). واکسن متاپنوموویروس پرندگان به روش داخل تخم مرغ در جنین جوجه ۱۸ روزه نیز می تواند تجویز شود و هیچ اثر نامطلوبی روی جوجه درآوری یا سلامت جوجه‌ها پس از تخم درآمدن ندارد و حتی تیترآنتی بادی به دست آمده بالاتر از پرنده‌های واکسینه شده در یک روزگی است (Hess et al., 2003).

در این مطالعه ارزیابی فارمی یک واکسن زنده متاپنوموویروس پرندگان در مزرعه جوجه گوشتی با سنجش شاخص های پرورشی، پاسخ آنتی بادی هومورال نسبت به واکسن و همچنین اندازه گیری پاسخ ایمنی علیه واکسنهای نیوکاسل، برونشیت و آنفلونزا در دو گروه آزمایش و کنترل منفی نشان داد که مقایسه آماری راندمان های پرورشی بصورت هفتگی از ۱ تا ۴۲ روزگی، در گروه های آزمایش و کنترل فاقد اختلاف معنی دار می باشد (P> ۰/۰۵). هم چنین تیتر های آنتی بادی و ضریب تغییرات (CV%) دو گروه آزمایش و کنترل منفی برای آنتی بادی علیه پنوموویروس و هم چنین برای نیوکاسل، برونشیت عفونی و آنفلونزا بین دو گروه اختلاف معنی داری نشان نمی دهد (P> ۰/۰۵). طبق تفسیر شرکت سازنده کیت، ۳ تا ۵ هفته پس از تجویز یک نوبت واکسن زنده پنومو ویروس در مزارع مادر و تخمگذار تجاری، تیتر آنتی بادی ۲۰۰۰ تا ۶۰۰۰ قابل انتظار می باشد. با اینحال، تجویز این واکسن در گله های گوشتی تجاری بدلیل کوتاهی زمان پرورش، پاسخ سرولوژی قابل اندازه گیری القاء نمی کند. پایین بودن تیتر های آنتی بادی ناشی از القاء واکسن زنده پنوموویروس در این مطالعه با یافته های علمی در دسترس همخوانی دارد. (Mundt, 2013; Naylor et al., 1997; Tarpey et al., 2007) گزارشات علمی تایید می‌کنند که ایمنی هومورال متعاقب یک نوبت واکسیناسیون زنده پنوموویروس

ضعیف بوده و حداقل در گله‌های گوشتی یا در مدت زمان کم بعد از تجویز، افزایش چندانی ندارد و ردیابی آن توسط آزمونهای سرولوژیک ارزش تشخیصی و تاییدی برای صحت واکسیناسیون ندارد.

واکسن زنده پنوموویروس با تحریک ایمنی سلولی و موضعی (مخاطی) مقاومت موثری در برابر بیماری ایجاد می کند و در حقیقت ایمنی سلولی نقش اصلی را در محافظت از این بیماری در طیور ایفاء می کند. بطوریکه در جوجه های بورسکتومی شده علیرغم عدم تولید آنتی بادی، واکسن زنده قادر به ایجاد محافظت کامل در برابر بیماری بوده است. عدم القاء پاسخ ایمنی هومورال قابل اندازه گیری حتی در عفونت های طبیعی نیز قابل انتظار است و اگرچه پاسخ سرولوژی مثبت بیانگر مواجهه با ویروس می باشد اما نتایج منفی در سرولوژی به معنی عدم مواجهه پرنده با ویروس نیست (Cook et al., 1989a; Cook et al., 1989b; Ganapathy et al., 2005; Jones et al., 1992). در این مطالعه، بالاتر بودن تیتر آنتی بادی علیه پنومو ویروس در گله کنترل منفی می تواند بدلیل چالش با سویه های وحشی و یا انتشار ویروس واکسن و چرخش آن در سطح پرندگان این سالن بدلیل مجاورت با سالن واکسینه باشد. بررسی نتایج عیار آنتی بادی علیه نیوکاسل در هر دو گروه آزمایش و کنترل بیانگر روند کاهشی عیار آنتی بادی در طی هفته های اول زندگی و سپس روند افزایشی آن در هفته های آخر می باشد. کاهش آنتی بادی می تواند ناشی از متابولیزه شدن آنتی بادی مادری و افزایش آن می تواند ناشی القاء ایمنی در اثر واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل باشد. چنین پدیده ای در مورد عیار آنتی بادی علیه آنفلوانزای پرندگان در این آزمایش، نیز قابل انتظار و مشاهده است. بر اساس این مطالعه، تجویز واکسن زنده پنوموویروس تاثیر معنی داری بر بهبود راندمان های پرورشی نداشت. گرچه مقایسه عددی دو گروه آزمایش، تلفات کمتر و وزن بالاتر را در گروه آزمایش نشان داد. چنین یافته ای با ادعای شرکت های سازنده واکسن و هم چنین نتایج فارمی منتشر شده در سایر مناطق جهان همخوانی دارد. عموما" شرکت های سازنده این واکسن نیز مدعی این مهم هستند که در مناطق آلوده به پنوموویروس، مصرف این واکسن در مزارع گوشتی موجب کاهش تلفات به میزان ۲ تا ۴ درصد می شود. در طول آزمایش و بعد از آن اثر سوئی ناشی از مصرف واکسن زنده پنوموویروس دیده نشد.

References

۱- جوکار، علی اکبر، پایان نامه دکترای دامپزشکی (۱۳۹۰). شماره پایان نامه ۱۱۲۸، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

۲- رفیع پور، فاروق، پایان نامه دکترای دامپزشکی (۱۳۹۰). شماره پایان نامه ۱۱۸۴، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

3- Banet-Noach, C., Simanov, L., Laham-Karam, N., Perk, S. and Bacharach, E., (2009). Longitudinal survey of avian metapneumoviruses in poultry in Israel: infiltration of field strains into vaccinated flocks. Avian Diseases 53:184–9.

4- Buys, S.B., Preez, J.H.D. and Els, H.J. (1989). The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. Journal of Veterinary Research. 57:87–98.

5- Catelli, E., Cecchinato, M., Savage, C.E. Jones, R.C. and Naylor, C.J. (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. Vaccine (24): 6476–82.

6- Collins, P.L., Whitehead, S.S., Bukreyev, A., Fearns, R., Teng, M.N., Juhasz, K., Chanock, R.M. and Murphy, B.R. (1999). Rational design of live-attenuated recombinant vaccine virus for human respiratory syncytial virus by reverse genetics. Advances in Virus Research (4): 423–451.

7- Cook, J.K.A., Orthel, F., Orbell, S., Woods, M.A. and Huggins, M.B. (1996). An experimental turkey rhinotracheitis (TRT) infection in breeding turkeys and the prevention of its clinical effects using live attenuated and inactivated vaccines. Avian Pathology (25): 231-243.

8- Cook, J.K.A., Ellis, M.M., Dolby, C.A., Holmes, H.C., Finney, P.M. and Huggins, M.B. (1989a). A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 1. Stability of the attenuated strain. Avian Pathology (18): 511– 522.

9- Cook, J.K.A., Holmes, H.C., Finney, P .M., Dolby, C.A., Ellis, M.M. and Huggins, M.B. (1989b). A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 2. The use of the attenuated strain as an experimental vaccine. Avian Pathology (18): 523–534.

10- Cook, J.K.A., Huggins, M.B., Orbell, S.J., Mawditt, K. and Cavanagh, D. (2001). Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. Avian Pathology (30): 233– 242.

11- Ganapathy, K., Cargill, P., Montiel E. and Jones,R.C.(2005).Interaction between live avian pneumovirus and Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens. Avian Pathology (34) 297–302.

12- Gulati, B.R., Patnayak, D.P., Sheikh, A.M., Poss, P.E. and Goyal, S.M. (2001). Protective efficacy of high passaged avian pneumovirus (APV/MN/ turkey /1a / 97) in turkeys. Avian Diseases, 45, 593 – 597.

13- Hess, M., Huggins, M.B. and Heincz, U. (2004). Hatchability, serology and virus excretion following in ovo vaccination of chickens with an avian metapneumovirus vaccine, Avian Pathology, 33(6): 576-580.

14- Homayounfar, N., Shoushtari, A., Charkhkar, S. and Bozorgmehrifard, M.H. (2013). Detection of avian metapneumovirus in commercial chicken flocks in East and West Azarbaijan provinces. Journal of Comparative Pathobiology, 10(2): 432-435

15- Hosseini, H. and Ghalyanchi-Langeroudi, A. (2012). Detection and Molecular Characterization of Avian Metapneumovirus in Iran: The First Report.Iranian

Journal of Virology, 6(2): 18-23.

16- Jones, R.C., Naylor, C.J., Al-Afaleq, A., Worthington, K.J. and Jones, R. (1992). Effect of cyclophosphamide immunosuppression on the immunity of turkeys to viral rhinotracheitis. Research in Veterinary Science (53): 38– 41.

17- Mundt, E. (2013). Diseases of Poultry, 13th Edition, Wiley blackwell Publicating Ltd, USA, pp.107-119.

18- Murphy, B.R., Prince, G.A., Collins, P.L., Coelingh, K.V.W., Olmsted, R.A., Sprigs, M.K., Parrott, R.H., Kim, H-W., Brandt, C.D. and Channock, R.M. (1988). Current approaches to the development of vaccines effective against parainfluenza and respiratory syncytial viruses. Virus Research (11): 1–15.

19- Naylor, C.J., Worthington, K.J. and Jones, R.C. (1997). Failure of maternal antibodies to protect young turkey poults against challenge with turkey rhinotracheitis virus. Avian Diseases (41):968–971.

20- Patnayak, D.P., Sheikh, A.M., Gulati, B. R. and Goyal, S.M. (2002). Experimental and field evaluation of a live vaccine against avian pneumovirus, Avian Pathology 31 (4): 377-382.

21- Rahimi, M. (2011). Seroprevalence of avian metapneumovirus infection in broiler and broiler breeder chickens in Iran. Veterinary Medicine, 56 (8): 395–399.

22- Tarpey, I. Huggins, M.B., Orbell, SJ. (2007). The efficacy of an avian metapneumovirus vaccine applied simultaneously with infectious bronchitis and Newcastle disease virus vaccines to specific-pathogen free chickens. Avian Diseases 51(2):594-6.

23- Williams, R.A., Savage, C.E., Jones, R.C. (1991a). Development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis. Avian Pathology 20:45–55.

24- Williams, R.A., Savage, C.E., Worthington, K.J., Jones, R.C. (1991b). Further studies on the development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis. Avian Pathology (20): 585–596.