ردیابی متاپنومومویروس پرندگان در گله‌های ماکیان استان‌های آذربایجان‌شرقی و آذربایجان‌غربی

نغمه همایونفر[۱*]، عبدالحمیدشوشتری[۲]، سعیدچرخکار[۱]، محمدحسن بزرگمهری‌فرد[۳]

چکیده

متاپنومویروس پرندگان عامل ایجاد عفونت حاد واگیردار دستگاه تنفسی فوقانی بوقلمون‌ها و ماکیان می‌باشد به علت اهمیتی که عفونت متا پنومویروسی در ایجاد بیماری تنفسی به تنهایی و یا توام با دیگر عوامل عفونی دارد این ویروس بعنوان یکی از عوامل دخیل در ایجاد سندرم تنفسی در گله‌های طیور محسوب می‌گردد. هدف از انجام این مطالعه ردیابی وتعیین هویت مولکولی متاپنومویروس پرندگان موجود درگله‌های طیور صنعتی استان‌های آذربایجان شرقی و غربی بود. از ۵۰ گله دارای علائم بیماری تنفسی شامل تورم در ناحیه سرو صورت، ترشحات بینی، سرفه، رال‌های نایی و کنژاکتویت کف‌آلود نمونه‌گیری بعمل آمد. نمونه‌ها شامل سواب از شکاف کامی، نای و بوقک‌های بینی پرندگان بودند که جهت انجام آزمایش RT–PCR به آزمایشگاه انتقال یافتند. پس از طی مراحل آزمایش موارد مثبت تعیین توالی نوکلئوتیدی شده و مورد آنالیز فیلوژنیک قرار گرفتند. از میان ۵۰ گله مورد بررسی تعداد ۸ گله از نظر وجود ژن G متاپنومویروس‌ها مثبت بودند که ۱۶٪ از کل نمونه‌های مورد آزمایش را شامل شد. تعیین توالی نوکلئوتیدی این ژن بیانگر این مطلب می‌باشد که نمونه‌های مثبت متعلق به تحت تیپ B ویروس می‌باشد. با بررسی درخت فیلوژنتیک سویه‌های ایرانی و سویه‌های واکسن‌های مورد مصرف در کشور مشخص گردید که بررسی درخت فیلوژنتیک سویه‌های ایرانی و سویه‌های واکسن‌های مورد مصرف در کشور، چنین می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های ایرانی دور از ویروس‌های واکسینال و در شاخه‌ای جداگانه قرار گرفتند. با بررسی نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ویروس‌های متاپنومویروس پرندگان از نقش قابل توجهی در بروز سندرم‌های تنفسی در گله‌های ماکیان استان‌های مذکور برخوردار می‌باشند.

واژگان کلیدی: *آنالیز فیلوژنیک، توالی نوکلئوتیدی، سندرم تنفسی*

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۰

مقدمه

متاپنومویروس پرندگان عامل ایجاد عفونت حاد واگیردار دستگاه تنفسی فوقانی بوقلمون‌ها و ماکیان و میزان تلفات متغیر می‌باشد. این ویروس باعث ایجاد عفونت در گونه‌های مختلف پرندگان می‌شود(۱۷و ۱۱). این ویروس در پرندگان مولد و تخم‌گذار باعث کاهش تولید و ایجاد ضایعات در پوسته تخم‌مرغ می‌گردد. عفونت‌های پنومومویروسی باعث بروز خسارات اقتصادی در گله‌های آلوده همچون افزایش ضریب تبدیل، کاهش رشد و کاهش بازدهی لاشه در صورت درگیری با عفونت‌های ثانویه در گله‌های گوشتی و کاهش تولید، افزایش موارد شکستگی پوسته تخم‌مرغ بدلیل ایجاد ضایعات در پوسته تخم مرغ و کاهش میزان جوجه درآوری در گله‌های مادر می‌گردد(۱۱).

متاپنومومویروس پرندگان جزء ویروس‌های RNAدار تک رشته‌ای غیر قطعه‌ای است که متعلق به خانواده پارامیکسومویریده، تحت خانواده پنومومویرینه و جنس متاپنومومویروس می‌باشد(۱۹). تا به حال ٤ تحت تیپ آنتی ژنیکی مجزای متاپنومومویروس پرندگان به نام‌های A، B، C و D بوسیله آزمایشات خنثی‌سازی با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و روش RT-PCR شناخته شده است (۱۵و ٦، ۵، ۱). ژنوم متاپنومومویروس پرندگان در حدود kb ۱۳ بوده که ۸ ژن به نام‌های نوکلئوکپسید (N)، فسفوپروتئین (P)، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، ماتریکس ثانویه (M_2)، هیدروفوبیک کوچک (SH)، گلیکوپروتئین(G) و RNA پلی مراز وابسته به RNA یا (L) را کد می‌کند(٤و۳). ژن G اصلی‌ترین پروتئین متغیر در بین ژن‌های متاپنومومویروس‌های پرندگان بوده و هدف اصلی برای

۱*ـ گروه بیماری‌های طیور، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران
nhomayounfar@yahoo.com
۲) بخش بیماری‌های طیور موسسه واکسن وسرم سازی رازی، کرج، ایران
۳ـ گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده می‌باشد. آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن G منجر به تعریف زیر گروه‌های A ,B ,C ,D شد (۱۰و ۹، ۸).

امروزه نقش عفونت‌های متا پنومو‌ویروسی در ایجاد بیماری تنفسی به تنهایی و یا بصورت توام با دیگر عوامل و همچنین کاهش تولید در گله‌های تخم‌گذار و کاهش درصد جوجه درآوری کاملا مورد اتفاق نظر است. باتوجه به اینکه در سال‌های اخیر در گله‌های طیور درگیر با سندرم‌های تنفسی علائم بالینی بصورت تورم سینوس‌های اطراف حدقه چشم، صداهای تنفسی، آبریزش از چشم و بینی و تورم سردیده میشود چنین گمان میرود که در این سندرم‌ها این ویروس‌ها نیز وجود داشته باشند.

در کشور ما اگر چه علائم بالینی مشابه با عفونت متاپنوموویروسی پرندگان در گله‌های ماکیان صنعتی توسط دامپزشکان شاغل در این صنعت گزارش شده و وجود آنتیبادی علیه متاپنوموویروس پرندگان در برخی از استان‌های کشور گزارش شده است (۲۰)، ولی هیچ گزارشی درباره ردیابی و شناسایی مولکولی این ویروس در گله‌های ماکیان صنعتی و تعیین تحت تیپ‌های آن صورت نگرفته است. بنابراین انجام چنین تحقیقی به منظور ردیابی ویروس مولکولی متا پنوموویروس پرندگان وتعیین تحت تیپ‌های موجود و مقایسه آنها با ویروس‌های موجود در سایر کشورها لازم و ضروری تشخیص داده شد.

مواد وروش کار

به منظور انجام این مطالعه از ۵۰ گله طیور تجاری استان‌های آذربایجان‌شرقی و آذربایجان‌غربی با علائم بالینی مشکوک به آلودگی به ویروس‌های متاپنومو ویروس پرندگان شامل تورم مشخص در ناحیه سرو سینوس‌های صورت، ترشحات بینی، سرفه، رال‌های نایی و کنژاکتویت کف‌آلود که به درمانگاه دامپزشکی طیور بخش خصوصی واقع در شهرستان تبریز از تاریخ مهرماه سال ۱۳۸۹ لغایت اردیبهشت ماه ۱۳۹۱ ارجاع داده شده بودند نمونه‌برداری گردید.

در مجموع تعداد ۴۳ مورد گله گوشتی، ۵ مورد گله تخم‌گذار تجاری و ۲ مورد گله مادر گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های اخذ شده شامل سواب استریل مرطوب از نواحی نای، بوقک‌های بینی و شکاف کامی بود. نمونه‌ها پس از اخذ در دمای ۱۸- فریز شده و در عرض ۵-۳ روز به آزمایشگاه مولکولار بخش بیماری‌های ویروسی طیور موسسه واکسن و سرم سازی رازی منتقل گردید.

استخراج RNA

جهت استخراج RNA ویروس از کیت High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Germany) با استفاده از روش پیشنهادی خود کیت انجام گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر مایع حاوی ترشحات عفونی جهت استخراج RNA استفاده شد. در نهایت RNA در ۵۰ میکرو لیتر از بافر مخصوص جمع آوری و تا هنگام استفاده در دمای ۷۰- نگهداری شد.

تکثیر با استفاده از واکنش RT-PCR

واکنش تکثیر ژنوم به منظور سه هدف انجام شد. این سه هدف به ترتیب ردیابی وجود ویروس، تعیین تحت تیپ و تعیین سکانس نوکلئوتیدی ژن G بود. هر سه هدف با انجام واکنش RT-PCR به صورت یک مرحله‌ای با استفاده از کیت Titan one step tube RT-PCR (Roch- Germanye) و پرایمرهای جدول ۱ دنبال گردیدند.

پرایمر	ژن	هدف RT-PCR	سایز محصول PCR	منبع
G_a/G_y	G	Detection	448 bp	Bayon-Auboyer et al.,1999
G_a/G_z	G	Sequencing	1196 bp	Bayon-Auboyer et al.,1999
G_a/G_2	G	Typing(A)	504 bp	Bayon-Auboyer et al.,1999
G_a/G_{12}	G	Typing(B)	312 bp	Bayon-Auboyer et al.,1999

جدول ۱ـ مشخصات پرایمرهای استفاده شده جهت ردیابی، سکانس ژن G و تعیین تیپ ویروس

Archive of SID

www.SID.ir

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن G با استفاده از ترموسایکلر Eppendorf Master Gradien عبارت بود از: ٤٥ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ دقیقه و سپس دناتوراسیون در ٩٤ درجه سانتیگراد به مدت ١ دقیقه، اتصال پرایمر در مدت ١ دقیقه (درجه حرارت لازم برای اتصال هر جفت پرایمر جهت تامین اهداف سه گانه تکثیر ژنوم ویروس به ترتیب ٥٢ و ٥٤ درجه سانتیگراد بود)، گسترش در ٦٨ درجه سانتیگراد به مدت ١ دقیقه و به تعداد ٣٤ سیکل انجام گردید. و در نهایت گسترش نهایی در ٦٨ درجه سانتیگراد به مدت ١٠ دقیقه انجام و محصولات واکنش در ٢٠- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

سکانس نوکلئوتیدی ژن G وآنالیز فیلوژنتیک

محصول RT-PCR بر روی ژل آگاروز Low melting point بمدت یک ساعت الکتروفورز گردید. سپس این محصولات با استفاده از کیت خالص سازی شرکت Roche آلمان خالص سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی نمونه‌های با استفاده از پرایمر G_a - G_z و با روش Comfort Read انجام شد. تمام اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژن G توسط نرم افزارهای Edit sequence (version 5.1) ویرایش گردید. درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor Joining با استفاده از نرم افزار Mega 5 رسم شد.

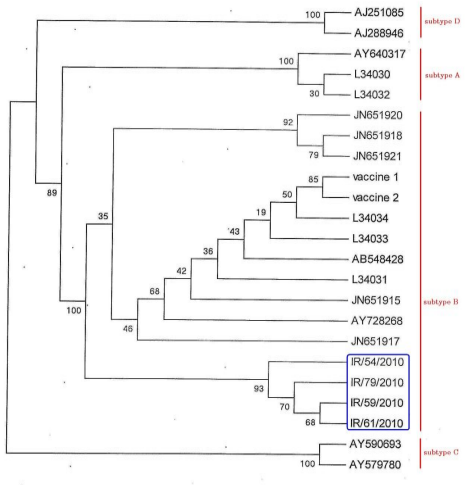
نتایج

از تعداد ٥٠ گله مورد آزمایش که دارای علائم تنفسی بودند تعداد ٨ گله از نظر وجود ژن G متاپنومو‌ویروس پرندگان مثبت بودند که این میزان معادل ١٦٪ کل نمونه‌ها میباشد. تمامی گله‌های مثبت از نظر حضور ویروس متعلق به گله‌های گوشتی بوده که در میانگین سنی ٥-٣ هفته قرار داشتند. گله‌های تخمگذار و مادر از نظر وجود این ژن منفی بودند. مشخصات گله‌هایی که از نظر وجود متاپنومو‌ویروس پرندگان مثبت بوده در جدول ٢ ذکر گردیده است.

جدول ٢ـ مشخصات گله‌هایی که از نظر وجود ژن G متاپنومو‌ویروس پرندگان مثبت بودند

شماره نمونه	نوع گله	سن گله	میزان تلفات روزانه	شهرستان
٥٤	گوشتی	٥ هفتگی	٪١	شبستر
٥٩	گوشتی	٤ هفتگی	٪٠/١	مراغه
٦١	گوشتی	٤ هفتگی	٪٠/٣	ملکان
٦٥	گوشتی	٣ هفتگی	٪٠/٣	مرند
٧٢	گوشتی	٥ هفتگی	٪٠/٥	ماکو
٧٩	گوشتی	٣ هفتگی	٪١/٣	خوی
٩٣	گوشتی	٥ هفتگی	٪٠/١	تبریز
١١٨	گوشتی	٥ هفتگی	٪٠/٠١	مراغه

آنالیز تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعه ای از ژن G نشاندهنده این مطلب بودکه نمونه‌های مثبت متعلق به تحت تیپ B ویروس میباشند. بررسی درخت فیلوژنتیک ژن G (نگاره ١) نشان دهنده این است که سویه های ایرانی با تحت تیپ B ویروس خوشه بندی شدند. ویروس واکسنهای متداول ومصرفی در کشور در خوشه بندی داخلی تحت تیپ B ودر خوشه ای جداگانه و کوچکتر از ویروس های مورد مطالعه قرار گرفتند.



نگاره ١ـ درخت فیلوژنتیک ژن G سویه های ایرانی وسویه های سایر تحت تیپ های موجود در جهان

www.SID.ir

بحث

اهمیت آلودگی به متاپنومو‌ویروس‌ها در بوقلمون بهتر از ماکیان شناخته شده است. صحت این موضوع که آیا این ویروس در ماکیان به عنوان عامل اولیه بیماری‌زایی دخالت دارد و یا نه بدرستی مشخص نمی‌باشد. اما در کشور ما به علت گستردگی آلودگی با سایر ویروس‌های تنفسی، ورود یک ویروس جدید مانند متاپنومو‌ویروس پرندگان چه بصورت اولیه وچه بصورت ثانویه بی شک باعث پیچیده‌تر شدن مشکلات بهداشتی واحدهای پرورش طیور می‌گردد. علیرغم اینکه در داخل کشور موارد گزارشات سرولوژیکی مربوط به وجود آنتی‌بادی علیه متاپنومو‌ویروس‌ها در گله‌های طیور صنعتی وجود دارد (۲۰) ولی کار منتشر شده‌ای در باره خود ویروس و نوع تحت تیپ آن در دسترس نمی‌باشد. در این مقاله تلاش بر این بوده که وجود این ویروس‌ها با ردیابی مستقیم خود ویروس به اثبات برسد. با توجه به اینکه جداسازی ویروس فرآیند بسیار پیچیده و وقت‌گیری می‌باشد لذا استفاده از روش‌های مولکولار جهت ردیابی وتعیین تحت تیپ این ویروس اهمیت فزاینده‌ای پیدا کرده است. تشخیص عفونت متاپنومو‌ویروسی پرندگان عموما بوسیله روش‌های جداسازی ویروس، سرولوژی و روش‌های مولکولی بوده که هرکدام از این روش‌ها دارای معایب و مزایایی در مقایسه با سایر روش ها می‌باشند. RT-PCR یک روش مناسب برای ردیابی متاپنومو‌ویروس های پرندگان بعلت دارابودن حساسیت و سرعت عمل بیشتر در مقایسه با روش های استاندارد جداسازی ویروس میباشد که علت این امر طبیعت مشکل پسند ویروس جهت رشد در محیط های کشت سلولی است(۱۰).

در بررسی که توسط Ongor و همکاران در ۲۰۱۰ انجام گرفت، هیچ مورد مثبتی از کشت‌های سلولی از نمونه‌های مثبت حاصل از RT-PCR گزارش نگردید که این یافته‌ها صحت گزارشات پیشین سایر محققین که بیان کرده بودند روش RT- PCR حساس‌تر از روش کشت سلولی است را تایید می‌نماید. عدم وجود نتایج مثبت در کشت سلولی می‌تواند بعلت عدم وجود ویروس زنده، تیتر پائین نمونه‌ها و زمان نامناسب اخذ نمونه باشد (۱۸). در این مطالعه ضمن ردیابی و تعیین تحت تیپ ویروس با روش RT-PCR و در نهایت با سکانس ژن G این ویروس، جایگاه ویروس‌های رد یابی شده در این مطالعه نسبت به ویروس‌های سایر مناطق و نیز ویروس‌های واکسن‌های رایج در کشور تعیین شد. نتایج RT-PCR با هدف ردیابی وجودمتاپنومو‌ویروس نشاندهنده حضور این ویروس در استان‌های آذربایجان‌شرقی و غربی بود. با توجه به عدم استفاده از واکسن در این مناطق در هنگام نمونه‌گیری امکان وجود ویروس واکسن در نمونه‌های اخذ شده در این مطالعه بعید به نظر می‌رسد. در مرحله بعد جهت تعیین تحت تیپ ویروس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تحت تیپ این ویروس بعنوان تحت تیپ B مشخص شد. تاکنون ٤ تحت تیپ از این ویروس در کشورهای مختلف شناسایی شده که تحت تیپ C فقط از آمریکا و تحت تیپ D فقط از فرانسه گزارش شده است (۱۰و ۹، ۸، ۱). در حالیکه دو تحت تیپ A و B در کشورهای مختلفی ردیابی گردیده است (١٤و ١٣، ٧، ٣). Banet-Noach و همکاران در سال۲۰۰۵ با بررسی٤٠ گله بوقلمون که ٣٤ گله سابقه واکسیناسیون بر علیه TRT را نداشتند موفق به ردیابی ویروس‌های تحت تیپ A و B از گله های مذکور شده و بیان نمودند که این ویروس‌ها متعلق به تحت تیپ B متاپنومو‌ویروس‌های پرندگان می‌باشند. آنها بابررسی آنالیز فیلوژنتیک این سویه‌ها دریافتند که سویه‌های بررسی شده در شاخه جداگانه ای از سایر سویه‌های اروپایی و واکسینال تحت تیپ B قرار داشتند (۲). Gharaibeh و Algharaibeh در سال ۲۰۰۷ به بررسی گله‌های طیور تجاری از نظر حضور ویروس متاپنومو‌ویروس پرندگان پرداخته وبیان نمودند که تمام ویروس‌های ردیابی شده متعلق به تحت تیپ B ویروس می‌باشند(۱۲).

Archive of SID

www.SID.ir

در بررسی حاضر گله‌های مثبت از لحاظ وجود متاپنومو‌ویروس پرندگان دارای علائم بالینی سرفه ترشحات بینی رالهای نایی کنژاکتویت کف آلود همراه با تورم شدید در ناحیه سینوسها و به تبع آن تورم در ناحیه سر بودند. نمونه‌های اخذ شده از گله‌ها بغیر از ردیابی متاپنومو‌ویروس پرندگان از لحاظ وجود سایرویروس‌های تنفسی شامل برونشیت عفونی، آنفلوآنزا و نیوکاسل نیز مورد بررسی قرار گرفتند (جزییات آزمایش ذکر نگردیده است). هیچکدام از ۸ گله مثبت ازنظر متاپنومویروس پرندگان ازلحاظ سه ویروس ذکر شده مثبت نبودند. گرچه نمونه‌های مورد ذکر از لحاظ باکتریایی مورد ارزیابی قرار نگرفتند ولی به نظر میرسد عامل اصلی ایجادکننده این علائم متاپنومو‌ویروس پرندگان بوده اند. گرچه نباید از نقش دیگر عوامل محیطی و باکتریایی در تشدید این علائم غافل بود. Chacon و همکاران در سال ۲۰۰۷ اقدام به بررسی وجود متا پنومو‌ویروس پرندگان در گله‌های تخمگذار تجارتی بدون سابقه واکسیناسیون بر علیه متاپنومو‌ویروس نمودند که تمامی نمونه ها ی مثبت جهت تشخیص تفریقی از نظر ویروس های برونشیت عفونی، نیوکاسل و لارنگوتراکئیت عفونی و نیز باکتری مایکوپلاسما گالیسپتیکوم مورد بررسی قرار گرفتند اما فقط متاپنومو‌ویروس پرندگان از نمونه‌ها ردیابی شد (۷).

در آنالیز فیلوژنیک ژن G به خوبی خوشه‌های جداگانه هر ٤ تحت تیپ مشخص بود. چهار ویروس سکانس شده در این مطالعه با تحت تیپ B خوشه بندی شدند که این نشان دهنده این مطلب میباشد که این ویروس‌ها متعلق به تحت تیپ B می‌باشند. در این مطالعه دو ویروس واکسن مورد استفاده در کشور نیز سکانس شدند این دو ویروس واکسن در خوشه بندی داخلی تحت تیپ B در خوشه ای جداگانه و کوچکتر از ویروس‌های مورد مطالعه قرار گرفتند. در تاریخچه اخذ شده از گله‌های مورد مطالعه که دلالت بر عدم استفاده از واکسن‌های مذکور داشت و مهمتر از آن جدا بودن ویروس‌های واکسن در آنالیز فیلوژنیک از ویروس‌های این مطالعه نشان‌دهنده این مطلب بود که ویروس‌های بررسی شده جز ویروس‌های وحشی هستند. در یک مطالعه اخیر در کشور برای اولین بار وجود متاپنومو‌ویروس در گله بوقلمون گزارش گردیده که باتوجه به دردسترس بودن سکانس این ویروس بررسی آنالیز فیلوژنیک نشان داد که این ویروس بوقلمون به ویروس‌های ماکیان مورد مطالعه در این تحقیق بسیار نزدیک می باشد (١٦). بنابراین به نظر میرسد که منشا ویروس‌های ماکیان در این مطالعه ویروس بوقلمون می باشد. این بررسی اولین گزارش ردیابی و شناسایی عفونت متاپنومو‌ویروسی پرندگان در گله های ماکیان صنعتی کشور میباشد که میتواند راهگشای مطالعات بعدی و بررسی‌های اپیدمیولوژیکی این عفونت‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به دلیل تقبل هزینه‌های مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Alvarez, R., Lwamba, H.M., Kapczynski, D.R., Njenga, M.K., Seal,B.S. (2003): Nucleotide and predicted amino acid sequence-based analysis of the avian metapneumovirus type C cell attachment glycoprotein gene: phylogenetic analysis and molecular epidemiology of U.S. pneumoviruses. J. Clin. Microbiol. 5: 1730 -1741.
2. Banet- Noach,C ., Simanov, L., Perk, Sh. (2005): Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains inturkeys and chickens. J.Avian Pathol. 34:220-226.
3. Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V.,Toquin, D., Cherbonnel, M., Eterradossi, N. (1999) : Comparison of F, G and N-based RT-PCRprotocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus.J. Arch. Virol. 144:1091-1109.

Archive of SID

www.SID.ir

4. Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D., Eterradossi, N. (2000): Nucleotide sequence of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses reveal a novel APV subgroup. J. of Gen. Virol. 81:2723-2733.
5. Buys, S.B., Du Preez, J.H. (1980): A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. Turkeys , 28, 36.
6. Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., Naylor, C.J. (1999): Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. J. Avian Pathol., 28: 593 -605.
7. Chacon, J.L., Brandao, P.E., Buim,M., Villarreal,L.,Ferreira,A.J.(2007):Detectio n by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil. J.Avian Pathol. 36:383-387.
8. Collins, M. S., Gough, R. E. , Alexander, D. J. (1993): Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. J. Avian Pathol. 22: 469-479.
9. Cook, J. K. A., Jones, B. V., Ellis, M. M., Jing, L., Cavanagh, D. (1993): Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies.J. Avian Pathol. 22: 257-273.
10. Cook, J.K.A., Cavanagh, D. (2002): Detection and differentiation of avian metapneumoviruses.J. Avian Pathol. 31:117 -132.
11. Easton, A.J., Domachowske, J.B., Rosenberg, H.F. (2004): Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. Clin. Microbiol. 17: 390-412.
12. Gharaibeh, S.M., Algharaibeh, G.R. (2007): Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan.J.Poult. Sci. 86: 1677-1681.
13. Gough, R.E., Manvell, R.J., S.E.N. Drury, S.E.N., Pearson, D.B. (1994): Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens.J.Vet. Rec. 134: 353-354.
14. Hafez, H.M. (1992): Comparative investigation on different turkey rhinotracheitis (TRT) virus isolates from different countries. Deutsche TieraXrtzliche Wochenschrift 99: 486-488.
15. Juhasz, K., Easton, A.J. (1994): Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. J. Gen. Virol. 75: 2873-2880
16. Mahmoodzadeh, M., Shoushtari, A., Haerian, B., Hashemi, A., Eshratabadi, F., Yousefi, A. (2012): Detection, subtyping and sequence analysis of a Turkey metapneumovirus in iran(abstract). 6th Iranian Congress of Virology.P:145.
17. Njenga, M.K., Lwamba, H.M., Seal, B.S. (2003): Metapneumoviruses in birds and humans.J. Virus Research. 91: 163 -169.
18. Ongor, H., Karahan, M., Bulut, H., Cetinkaya, B. (2010): Detection of avian metapneumovirus subtypes in turkeys using RT-PCR. J.Vet. Rec. 166:363-366.
19. Pringle,C.R.(1998):Virus Taxonomy-San Diego 998.J.Arch.Virol. 143: 1449-1459.
20. Rahimi, M. (2011): Seroprevalence of avian metapneumovirus infection in broiler and broiler breeder chickens in Iran. J. Vet. Medicina, 8:395-399.

Archive of SID
www.SID.ir