DOI:10.22092/VJ.2020.342570.1713
شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

بررسی میزان دوز عفونی و سرعت تکثیر واکسن‌های لاسوتا و کلون لاسوتا بیماری نیوکاسل

• **محمد عبدالشاه**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران
• **حسین حسینی**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
• **محمدحسین فلاح مهرآبادی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران
• **آرش قلیان‌چی لنگرودی (نویسنده مسئول)**
گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی ،دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ، تهران ، ایران

تاریخ دریافت: ۲۲-۰۱-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۲۵-۰۵-۱۳۹۹
Email: ghalyana@ut.ac.ir

چکیده

بیماری نیوکاسل، با توجه به سرایت بالا و گسترش سریع در بین ماکیان و سایر گونه‌های پرندگان، یک بیماری ویروسی کشنده و تهدیدی جهانی برای صنعت طیور در سراسر دنیا محسوب می‌گردد. جهت کنترل این بیماری از واکسن‌های زنده و کشته از سویه لنتوژن و مزوژن استفاده می‌گردد. یکی از واکسن‌های رایج در کنترل بیماری نیوکاسل سویه تنفسی لاسوتا می‌باشد که به دو صورت لاسوتا و کلون لاسوتا تولید داخل (موسسه رازی) و وارداتی از شرکت‌های مختلف در کشور وجود دارد و یکی از موارد قابل بحث تفاوت واکسن‌های لاسوتا و کلون لاسوتا در شرایط فارم بود . در این مطالعه اولین مرحله از مقایسه در راستای تعیین دز عفونی (EID_{50}) و سرعت تکثیر بود که طبق پروتکل‌های استاندارد کنترل کیفی واکسن انجام گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که واکسن‌های مورد استفاده دارای تفاوت‌های قابل توجه در میزان دز عفونی بود. واکسن‌های تولید داخل (موسسه واکسن و سرم سازی رازی) دارای دز عفونی و سرعت تکثیر مناسب بودند. در مورد تفاوت سرعت تکثیر نتایج اولیه مطالعه نشان داد که بین واکسن‌های مختلف تفاوت وجود دارد و این اولین قدم در تایید بازخورد های فیلدی می‌باشد. با توجه به تفاوت‌های زیاد در دز عفونی پیشنهاد می‌گردد در کنترل کیفیت واکسن‌ها، به جز رعایت دستورالعمل‌های استاندارد بین‌المللی، شاخص‌های دیگر ناظر بر میزان کارآیی آن‌ها بطور جدی و مستمر ادامه یابد.

کلمات کلیدی: بیماری نیوکاسل، واکسن، لاسوتا، کلون، دوز عفونی، ایران

Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 2-7

Evaluation of the infectious dose and the rate of replication of Lasota and Cloned Lasota vaccines in Newcastle disease

By: Abdoshah, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Hosseini, H., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran. Fallah Mehrababdi, M. H., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Ghalyanchi Laageroudi, A., (Corresponding Author) Department of Microbiology and Immunology, University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran, Iran.

Received: 2020-04-10 **Accepted: 2020-08-15**

Email: ghalyana@ut.ac.ir

Newcastle Disease is a fatal viral disease and considered a global threat to the poultry industry all over the world. Both live and killed Lentogenic, and Mesogenic vaccines are used to control this disease. One of the common vaccines used in preventing strategy of ND is the Lasota as a pneumotropic strain, which is available in two forms of Lasota and Cloned Lasota, internally produced (Razi Institute) and imported from various companies in the country, and one of the most controversial issues was the difference between Lasota and Cloned Lasota vaccines in farm conditions. In this study, the first step in the comparison was to determine the EID_{50} and the rate of replication, which was performed. The results showed that the used vaccines had significant differences in the amount of infectious dose. Internally produced vaccines (Razi Vaccine and Serum Institute) had an appropriate infectious dose and reproduction rate. Regarding the difference in the rate of reproduction, the primary results revealed that there is diversity between different vaccines, and this is the first step in confirming the field feedback. Due to a large amount of variety in infectious dose, in controlling the quality of vaccines, it is suggested, in addition to observation of international standard guidelines, other indicators which are monitor to their effectiveness keep to continue seriously and pay attention to cold chain and standard transport conditions.

Key words: *Newcastle disease, LaSota, Cloned LaSota, Iran*

مقدمه

بیماری نیوکاسل (ND) یک بیماری ویروسی است که اولین بار در سال ۱۹۲۶ در نیوکاسل انگلستان و در سال ۱۹۵۰ در ایران تشخیص داده شد. بیماری نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که در طیور صنعتی که بصورت متراکم پرورش داده می‌شوند، مشاهده شده و در صورت عدم واکسیناسیون، بسیاری از گله‌های تجاری طیور به آن مبتلا می‌گردند. عفونت با ویروس حاد بیماری نیوکاسل (vNDV) به شکل بومي در کشورهاي درگير، منجر به خسارات اقتصادي قابل توجهي در صنعت طیور می‌شود که خسارات عمدتاً به علت عدم ایمنی لازم، موجب کاهش نرخ رشد، کاهش تولید تخم‌مرغ در پرندگان واکسینه شده و افزایش میزان مرگ و میر در پرندگان غیر واکسینه می‌شود (۲، ۵). در واکسیناسیون بمنظور کنترل و پیشگیری بیماری نیوکاسل سه هدف اصلی وجود دارد: ۱) کاهش یا حذف اشکال بالینی ناشی از بیماری ۲) کاهش میزان ویروس حاد دفع شده و ۳) افزایش دوز عفونی ویروس چالش (۵). واکسن‌هایی که در ایران و بسیاری از کشورها، برای پیشگیری بیماری نیوکاسل مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل سویه لاسوتا (LaSota) و سایر ویروس‌های زنده‌ای هستند که در اوایل و اواخر دهه ۱۹۵۰ جدا شده‌اند (۴). سویه لاسوتا، نخستین بار در فوریه ۱۹۴۶ از مزرعه آدام لاسوتا در وست وود، نیوجرسی از جوجه‌هایی جدا و شناسایی شد که وی برای معاینه پس از مرگ ارسال کرده بود (۹، ۱۲). در صنعت طیور کشور، از واکسن‌های مختلف زنده تخفیف حدت‌یافته علیه بیماری نیوکاسل که دارای گرایش تنفسی (B1, Lasota, cloned LaSota) و گوارشی (PHY.LMV.42 و 10/ND6, VG/GA) هستند، مصرف می‌گردد. شاخص بیماری‌زایی استاندارد در بین ویروس‌های نیوکاسل، شامل ضریب بیماری‌زایی داخل مغزی (ICPI) می‌باشد. طبق دستورالعمل OIE، مقادیر ICPI کمتر از ۰/۷ نشان‌دهنده ویروس‌های کم‌حدت NDV است که به صورت بالقوه قابلیت استفاده در واکسن را دارند. این شاخص در حال حاضر برای ویروس‌های غیرحاد واکسینال موجود در بازار از ۰/۰ تا ۰/۴۴ متغیر است (۱۵). در این میان، لاسوتا دارای بالاترین شاخص بیماری‌زایی بوده که این مقدار از ۰/۲ تا ۰/۴۴ متغیر می‌باشد (۹).

علاوه بر شاخص ICPI، تفاوت در گرایش و توانایی تکثیر در تخم‌مرغ جنین‌دار در بین سویه‌های مختلف واکسن‌های زنده ویروس بیماری نیوکاسل مطرح می‌شود که به صورت متوسط تیتر عفونی (EID_{50}) نمایش داده می‌شود و بیشترین میزانِ آن در سویه LaSota مشاهده شده است (۱۵). سویه LaSota تقریباً در همه کشورهایی که ویروس حاد NDV در آنها بومی است، استفاده می‌گردد (۷). با توجه به بروز واکنش‌های پس از واکسیناسیون در استفاده از سویه‌ی لاسوتا، سویه‌ی کلون لاسوتا از برندهای مختلف تجاری تولید و در بازار ارائه شد که از نظر شاخص ICPI ملایم‌تر از سویه LaSota می‌باشد. در این مطالعه یک پروتکل استاندارد برای ارزیابی تجربی قدرت تکثیر واکسن‌های زنده لاسوتا و کلون لاسوتا تهیه شده است تا تفاوت عملکرد این دو واکسن برای اولین بار در شرایط آزمایشگاهی از یک سویه مورد استفاده در شرکت‌های تولیدکننده تجاری مختلف، مشخص شود.

مواد و روش کار

نمونه واکسن‌ها

تعداد استاندارد و مناسب از واکسن لاسوتا و کلون لاسوتای موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی و لاسوتای سه شرکت خارجی (AA,D,E) و واکسن کلون لاسوتای سه شرکت خارجی (A,B,C) از دفاتر مرکزی بخش شرکت‌های واردکننده دریافت شد. شماره تولید و تاریخ انقضا همه واکسن‌ها ثبت گردید. از یک شرکت خارجی نیز واکسن کلون لاسوتا (A) و لاسوتای معمولی (AA) برای مقایسه نیز فراهم شد. در مجموع چهار واکسن لاسوتا و چهار واکسن لاسوتا کلون در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین عیار ویروس موجود در هر دوز واکسن

این مرحله طبق دستورالعمل استاندارد، جهت عیارسنجی ویروس موجود در هر دوز از واکسن‌های تحت آزمایش انجام گرفت و عیار ویروس زنده موجود در هر دوز واکسن محاسبه شد. به ازای هر ۱۰۰۰ دوز واکسن موجود در هر ویال PBS ۱ ml، استریل اضافه و از مخلوط به دست آمده رقت‌های یک تا نه با مضرب ۱:۱۰، تهیه و به مقدار ۰/۱ ml از هر رقت به تخم‌مرغ‌هاي SPF جنین‌دار ۱۰-۹ روزه تلقیح شدند. براي هر رقت ۵ تکرار لحاظ شد. تخم‌مرغ‌های تزریق شده روزانه و تا شش روز نوربینی شدند. تلفات در ۲۴ ساعت نخست، مکانیکی تلقی و از آزمایش حذف شدند. تلفات جنینی از روز دوم به یخچال چهار درجه منتقل شدند. در پایان روز ششم همه تخم‌مرغ‌های تزریق شده دارای جنین زنده به یخچال انتقال یافتند تا جنین‌ها به روش انسانی دچار مرگ شوند. در روز هفتم مایع آلانتوییک همه تخم‌مرغ‌ها از نظر وجود فعالیت هماگلوتینین با آزمایش HA بررسی شدند و در ۵۰ درصد از تخم‌مرغ‌های تزریق شده، تعیین عیار ویروس عفونت‌زا به ازای هر دوز واکسن (EID_{50}/dose) بر اساس روش Read and Munch صورت پذیرفت (۳).

تعیین سرعت تکثیر در تخم‌مرغ SPF

میزان 10^4 EID_{50} در حجم ۱۰۰میکرولیتر از هر یک از واکسن‌های مورد نظر به طور یکسان به ۱۰ تخم‌مرغ جنین‌دار SPF ۱۱-۹ روزه تلقیح شد. تخم‌مرغ‌های تزریق شده روزانه نوربینی شدند. تلفات ۲۴ ساعت نخست، مکانیکی تلقی و از آزمایش حذف شدند. تلفات جنینی از روز دوم و تمام تخم‌مرغ‌ها بعد از ۶۴ ساعت به یخچال چهار درجه انتقال یافتند. بعد از ۲۴ ساعت، مایع آلانتوییک همه تخم‌مرغ‌ها برداشت و سانتریفوژ شد تا ناخالصی‌های آن جدا شود. سپس میزان ذره عفونی بر حسب EID_{50} برای محصول به دست آمده از تکثیر ۶۴ ساعته ویروس‌ها جهت تعیین سرعت تکثیر ویروس در یک مدت زمان خاص بدست آمد (۳).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Office Excel انجام گردید.

جدول ۱- میزان امتیاز کلی به واکسن‌های مختلف براساس دوز عفونی و سرعت تکثیر.

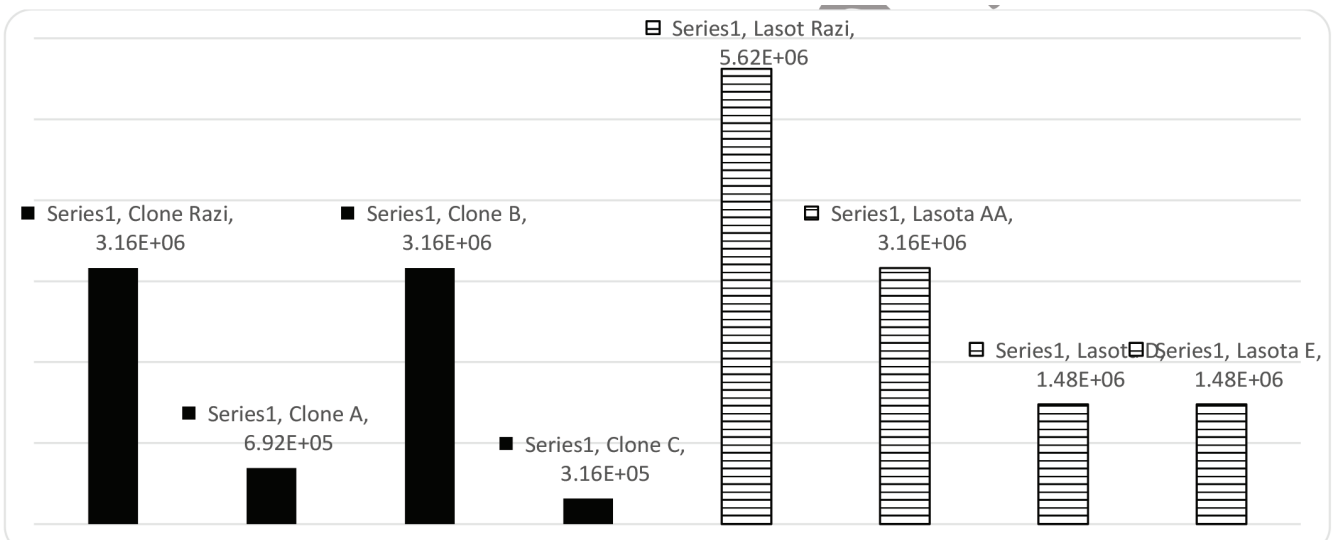
ردیف	واکسن	امتیاز دوز عفونی	امتیاز سرعت تکثیر	امتیاز کل
۱	LaSota Razi	۵	۵	۱۰
۲	Clone Razi	۴	۵	۹
۳	LaSota AA	۴	۴	۸
۴	LaSota E	۳	۵	۸
۵	Clone B	۴	۴	۸
۶	LaSota D	۳	۴	۷
۷	Clone A	۲	۵	۷
۸	Clone C	۱	۴	۵

نتایج

در آزمایش تعیین عیار ویروس موجود در هر دوز واکسن، میزان دوز عفونی در واکسن‌های مختلف با یکدیگر تفاوت داشت، بطوری‌که بیشترین EID_{50} بین واکسن‌های لاسوتا، مربوط به لاسوتای رازی (5.62E+06) و کمترین آن (1.48E+06) مربوط به لاسوتای شرکت E بود، که ۳/۸ برابر کمتر می‌باشد. در بین واکسن‌های کلون بیشترین EID_{50} مربوط به کلون رازی و کلون شرکت B (3.16E+06) و کمترین آن (3.16E+05) مربوط به کلون شرکت C بود که ۱۰ برابر کمتر بود (شکل ۱). در آزمایش دوم نیز میزان سرعت تکثیر ویروس با یکدیگر تفاوت‌هایی داشتند. در بین واکسن‌های لاسوتا، بیشترین میزان تکثیر مربوط به واکسن‌های لاسوتای رازی و لاسوتای شرکت E بوده و در بین واکسن‌های کلون به کلون رازی و کلون شرکت A تعلق داشت (3.16E+10) (شکل ۲).

بحث

بیماری نیوکاسل یکی از بیماری‌های رایج در صنعت طیور بوده و سالانه خسارات فراوانی را به این صنعت وارد می‌کند (۱، ۱۰) .برای کنترل این بیماری از واکسن‌های مختلفی استفاده می‌شود. از بین واکسن‌های نیوکاسل و بویژه واکسن‌های با گرایش تنفسی، ویروس B۱ هیچنر از قدیمی‌ترین سویه‌های ویروس بیماری نیوکاسل بوده که به دلیل ملایم بودن ویروس، محدودیت تکثیر در حضور آنتی‌بادی مادری برای این واکسن مطرح می‌باشد. همچنین قدرت انتقال جوجه به جوجه در آن پایین بوده که به این دلیل محافظت ضعیف‌تری را برای سویه B1 Hitchner علیه سویه‌های حاد نیوکاسل در نظر می‌گیرند (۶). با توجه به مشکلات ذکر شده برای سویه B1 Hitchner، واکسن لاسوتا برای حل این مشکل استفاده گردید، چراکه این سویه قابلیت تکثیر در حضور میزان بالای آنتی‌بادی مادری را دارا می‌باشد، هرچند که بعد از واکسیناسیون واکنش‌های التهابی در آن گزارش شده است. سویه‌ی لاسوتا با دوز $۱۰^{۶}$ یا بالاتر در واکسن‌های تجاری موجود، سبب ایجاد پاسخ‌های قوی ایمنی هومورال می‌گردد (۶). همچنین محققین در مطالعات، شاهد مقادیر مشابهی از زنده‌مانی پرندگان و دفع ویروس با استفاده از واکسن LaSota در جوجه‌های SPF، پس از چالش با سویه‌های حاد NDV متعلق به ژنوتیپ VII بوده‌اند (۱۶). نتایج مطالعه کورناکس و همکاران نشان داد که در هنگام استفاده از دوز بسیار بالای این واکسن، می‌توان به هر سه هدف واکسیناسیون از جمله کاهش اشکال بالینی بیماری، کاهش میزان دفع ویروس حاد و افزایش دوز عفونی ویروس چالش دست یافت (۶). به نظر می‌رسد این نتایج با نتایج به دست‌آمده در مزرعه تایید می‌گردد، که اغلب در آن با یک استراتژی واکسیناسیون تهاجمی‌تر می‌توان منجر به بهبود در کنترل نیوکاسل شد (۸). در سال‌های اخیر کارایی واکسیناسیون با سویه LaSota برای القای ایمنی محافظتی در برابر سویه‌های مختلف هترولوگ مورد بحث بوده است. گزارش‌های متعددی حاکی از آن است که استفاده بیشتر از سویه‌های دارای تفاوت‌های ژنتیکی به عنوان سویه‌های واکسینال، احتمالاً انتخاب خوبی برای کنترل بیماری نیوکاسل نباشد، زیرا نمی‌توانند از دفع ویروس و انتقال ویروس جلوگیری کند. همچنین گزارش‌هایی در مورد توانایی سویه‌های واکسینال متعلق به ژنوتیپ II و I وجود دارد که قادرند در برابر تلفات و ابتلا در برابر ژنوتیپ‌های II ،VII ،VI و IX محافظت کامل ایجاد کنند (۱۴) .در شرایط آزمایشگاهی

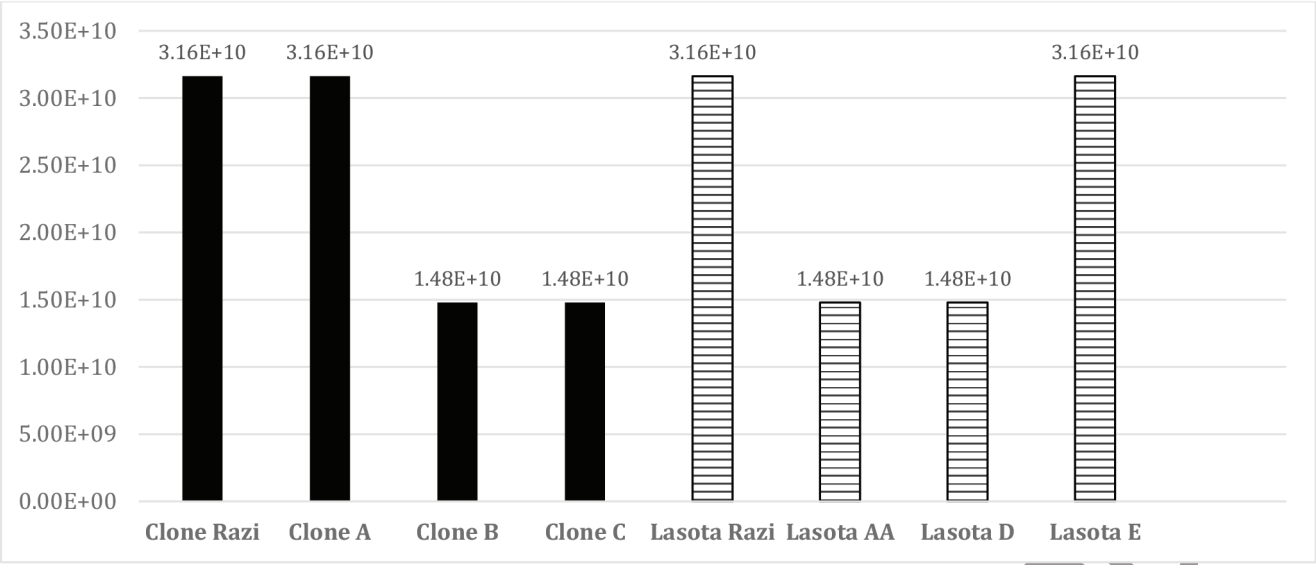


شکل ۱- میزان EID_{50} واکسن‌های مختلف لاسوتا در ایران.

به‌طور معمول ۱۰۰ درصد زنده‌مانی در پرندگان واکسینه شده و تحت چالش با سویه‌های vNDV، چه با واکسن‌های همولوگ و چه هترولوگ (ژنوتیپ‌های مختلف) نسبت به ویروس چالش مشاهده شده است. در عین حال کاهش عملکرد واکسن‌ها، اغلب در مزرعه دیده می شود (۱۲,۴). بدلیل بروز واکنش‌های بعد از واکسیناسیون در استفاده از سویه لاسوتا، محققین سویه کلون لاسوتا را پیشنهاد نمودند. ویروس کلون لاسوتا پس از واکسیناسیون قابلیت تکثیر کمتری در حضور آنتی‌بادی مادری داشته و در مطالعات قابلیت انتقال جوجه به جوجه را نشان داده است (۶). در واقع ICPI این واکسن تقریباً برابر واکسن B1 Hitchner می‌باشد (۷). واکسن Clon30 از اولین سویه‌های کلون شده از ویروس‌های اجدادی این ویروس بوده و بعد از آن شرکت‌های مختلف به تهیه سویه خاص کلون خود اقدام نمودند. در ایران نیز، واکسن کلون IR.12، از سویه ویروس لاسوتا به روش پلاک سنجی (Plaque Assay) در موسسه رازي تهیه و تولید گردیده و در چرخه مصرف کشور قرار گرفته است (۸). نتایج این مطالعه نشان داد واکسن‌های تجاری موجود در بازار از لحاظ دوز عفونی، متفاوت بوده و بایستی سازمان دامپزشکی، نظارت بیشتری برای کنترل کیفی کلیه این واکسن‌ها داشته باشد. این تفاوت را می‌توان مربوط به شرایط تولید، شرایط حمل و نگهداری واکسن دانست. برای کنترل این وضعیت پیشنهاد می‌شود دوز عفونی واکسن‌های داخلی و وارداتی قبل از اخذ مجوز پخش مورد بررسی مجدد قرار گیرند. همچنین زنجیره سرد واکسن‌های زنده بدقت نظارت گردد. در نتایج بدست آمده از این مطالعه، واکسن‌های تولید داخل نیز توانستند نمره بالایی را در این خصوص ثبت کنند. همکاران دامپزشک در شرایط مزرعه بیشتر اشاره بر عملکرد مناسب واکسن موسسه رازی بعلت ایجاد واکنش پس از واکسن و تحریک مخاطی داشتند، که این گزارشات منطبق با نتایج مناسب این واکسن در ایجاد دوز عفونی مناسب و سرعت تکثیر سویه لاسوتای تولید شده در این موسسه می‌باشد. در زمینه سرعت تکثیر ویروس، در بین واکسن‌های لاسوتا و کلون لاسوتا تفاوت وجود داشت. نکته جالب در این مطالعه این بود که سویه کلون لاسوتا موسسه رازی و سویه معمولی آن دارای سرعت تکثیر یکسانی بودند، همچنین در مورد کمپانی A که واکسن لاسوتا و کلون آن با یکدیگر مقایسه شده بود، سویه کلون کمپانی A سرعت تکثیر بیشتری داشت که تفاوت در سرعت تکثیر را می‌توان به جهش‌های نقطه‌ای موجود در بذر هر یک از سویه‌های واکسن، کیفیت ساخت، تحت جمعیت‌های متعدد و شماره پاساژ ویروس نسبت داد. در ادامه این سرعت تکثیر متفاوت باید در میزبان طبیعی مانند جوجه SPF و تجاری، مورد آزمایش قرار گیرد تا بتوان به این نتیجه رسید که سرعت تکثیر متفاوت چه تاثیری بر روی سرعت و میزان تیتر ایجاد شده در جوجه میزبان می‌گذارد. تعیین توالی کامل ژنوم واکسن‌های زنده جهت بررسی جهش‌های ناشی از پاساژ و کنترل کیفی ژنتیکی آن و همچنین محاسبه ICPI ویروس توصیه می‌گردد. در پایان پیشنهاد می‌شود این کار بر روی سایر واکسن‌های زنده داخلی و وارداتی جهت پایش کیفی واکسن‌ها صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری نهایی

واکسن‌های لاسوتا و کلون لاسوتا مورد استفاده در این مطالعه که مربوط به تولیدات شرکت های داخلی و خارجی بود، دارای دوز



شکل ۲- میزان ویروس تکثیر شده سویه لاسوتا در واکسن‌های مختلف که نشان دهنده سرعت تکثیر بالاتر است.

عفونی و سرعت تکثیر متفاوتی بودند، بنابراین انتظار بازخوردهای متفاوت فارمی قابل توجیه می‌باشد. به طور کلی لاسوتا و کلون لاسوتای شرکت رازی نسبت به سایر شرکت‌ها دارای دوز عفونی بالاتری بود. همچنین از نظر سرعت تکثیر نیز لاسوتا و کلون لاسوتای شرکت رازی از سایر شرکت‌ها بهتر بودند. از نظر امتیازدهی بر اساس دوز عفونی و سرعت تکثیر واکسن لاسوتای شرکت رازی بهترین واکسن انتخاب شد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای مهندس بهروز اسدی، کارشناس بخش میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Alexander, D. J., E. W. Aldous and C. M. Fuller. 2012. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian pathology.* 41: 329-335.

2- Alemian, A., S. A. Pourbakhsh, A. Shoushtari and H. Keyvanfar. 2020. Isolation and Molecular Identification of Newcastle Disease Virus in Rural Poultry in Northern Provinces of Iran. *Archives of Razi Institute*.

3- Allan, W. H., J. E. Lancaster and B. Toth. 1978. Newcastle disease vaccines: Their production and use (FAO animal production and health series). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome.

4- Bhuvaneswari, S., K. Tirumurugaan, P. Venkatesan, P. M. Kumar and K. Kumanan. 2017. Evaluating the efficacy of LaSota vaccination induced protection in chickens upon challenge with a genotype IV strain of Newcastle disease virus. *Virus Disease.* 28: 328-336.

5- Cardenas-Garcia, S., D. G. Diel, L. Susta, E. Lucio-Decanini, Q. Yu, C. C. Brown, P. J. Miller and C. L. Afonso. 2015. Development of an improved vaccine evaluation protocol to compare the efficacy of Newcastle disease vaccines. *Biologicals.* 43: 136-145.

6- Cornax, I., P. J. Miller and C. L. Afonso. 2012. Characterization of live LaSota vaccine strain–induced protection in chickens upon early challenge with a virulent Newcastle disease virus of heterologous genotype. *Avian Diseases.* 56: 464-470.

7- Diel, D. G., L. Susta, S. C. Garcia, M. L. Killian, C. C. Brown, P. J. Miller and C. L. Afonso. 2012. Complete genome and clinico-pathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. *Journal of Clinical Microbiology.* 50: 378-387.

8- Dimitrov, K. M., C. L. Afonso, Q. Yu and P. J. Miller. 2017. Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*. 206: 126-136.

9- Kaffashi, A., M. Mahmoudzadeh and S. Ataei Kachooei. 2021. Development of TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Chicken Anemia Virus in Newcastle Disease Vaccines. *Archives of Razi Institute*. 76: 421-427.

10- Kalantari, A., S. Farashi Bonab, H. Keyvanfar and P. Mortazavi. 2020. Evaluation of Apoptosis Induction by Newcastle Disease Virus LaSota Strain in Human Breast Carcinoma Cells. *Archives of Razi Institute*. 75: 367-376.

11- Gits, J. and N. Zygraich.1978. Potential as an aerosol vaccine of an improved Newcastle disease vaccine derived from the LaSota strain—I. In vitro studies. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 1: 49-58.

12- Goldhaft, T. M. 1980. Guest editorial: Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. *Avian Diseases.* 24: 297-301.

13- Jeon, W. J., E.K. Lee, J.H. Kwon and K.S. Choi. 2008. Full-length genome sequence of avian paramyxovirus type 4 isolated from a mallard duck. *Virus Genes.* 37: 342-350.

14- Liu, X., H. Wan, X. Ni, Y. Wu and W. Liu. 2003. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985–2001. *Archives of virology.* 148: 1387-1403.

15- Omony, J. B., A. Wanyana, H. Kirunda, K. K. Mugimba, J. L. Nakavuma, M. Otim-Onapa and D. K. Byarugaba. 2017. Immunogenicity and protection efficacy evaluation of avian paramyxovirus serotype-1 (APMV-1) isolates in experimentally infected chickens. *Avian Pathology.* 46: 386-395.

16- Samuel, A., B. Nayak, A. Paldurai, S. Xiao, G. L. Aplogan, K. A. Awoume, R. J. Webby, M. F. Ducatez, P. L. Collins and S. K. Samal. 2013. Phylogenetic and pathotypic characterization of Newcastle disease viruses circulating in West Africa and efficacy of a current vaccine. *Journal of Clinical Microbiology.* 51: 771-781.