

ردیابی مولکولی آدنووایروس‌های ماکیان مرتبط با رخداد بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در مزارع مرغ گوشتی استان‌های مازندران، فارس و تهران

• امین میرزازاده قصاب

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

• نجمه مصلح (نویسنده مسئول)

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

• کرامت اساسی

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

• محمدعباس نیا

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

• بهمن عبدی هاچسو

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران



تاریخ دریافت: ۲۱-۰۶-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۲۲-۰۲-۱۴۰۰

Email: nmosleh@shirazu.ac.ir

چکیده

بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی با عامل آدنووایروس‌های ماکیان، به دلیل ایجاد تلفات در مزارع گوشتی از بیماری‌های مهم در صنعت طیور محسوب می‌شود. مطالعه حاضر به منظور ردیابی و طبقه‌بندی مولکولی آدنووایروس‌های ماکیان مرتبط با رخداد‌های بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در مزارع مرغ گوشتی کشور انجام شد. در یک بازه زمانی ۳ ساله، ۲۲ رخداد بیماری در مزارع با سنین ۷ تا ۴۲ روزگی در استان‌های مازندران، فارس و تهران به ثبت رسید. در هر مورد بعد از اخذ تاریخچه و ثبت جراحات کالبدگشایی، نمونه‌های ویروس‌شناسی و آسیب‌شناسی از بافت کبد پرندگان بیمار اخذ شد. بررسی ویروس‌شناسی با انجام آزمون زنجیره پلی‌مرز در زمان حقیقی بر روی ژن 52K آدنووایروس‌های ماکیان و بررسی میکروسکوپی بافت کبد بعد از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین انجام شد. بررسی آسیب‌شناسی بافت کبد نشان‌دهنده بروز هپاتیت نکروزان به همراه حضور گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای، منتسب به آدنووایروس‌های ماکیان، بود. آزمون مولکولی و بررسی سکانس توالی نوکلئوتیدی ژن 52K، نشان از نقش ۱۹ گونه D و ۳ گونه E آدنووایروس‌های ماکیان در رخداد‌های بیماری هپاتیت به همراه گنجیدگی داشت. مطالعه حاضر نشان‌دهنده نقش غالب گونه‌های D و E آدنووایروس‌های ماکیان در ایجاد بیماری هپاتیت به همراه گنجیدگی می‌باشد. با توجه به گستردگی صنعت طیور کشور، یافته‌های همه‌گیرشناسی مطالعه حاضر در استان‌های مذکور می‌تواند در جهت کنترل و پیشگیری از این بیماری در کشور مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: آدنووایروس‌های ماکیان، تورم کبد همراه با گنجیدگی، مرغ گوشتی، ایران

• Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 58-65

Molecular detection of fowl adenoviruses associated with inclusion body hepatitis outbreaks in broiler flocks of Mazandaran, Fars, and Tehran provinces

By: Mirzazadeh ghassab, A., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. Mosleh, N., (Corresponding Author) Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. Asasi, K., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. Abbasnia, M., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. and Abdi Hachesoo, B., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: 2020-09-11

Accepted: 2021-05-12

Email: nmosleh@shirazu.ac.ir

Inclusion body hepatitis (IBH) with the causative agent of fowl adenoviruses (FAdVs), due to incurring mortality in broiler farms, is considered a significant disease in the poultry industry. The present study was undertaken to detect and molecularly classify FAdV associated with outbreaks of IBH in broiler farms in Iran. Over 3 years, twenty-two outbreaks of IBH, in farms with ages between 7 to 42 days, were recorded in Mazandaran, Fars, and Tehran provinces. In each case, after taking history and recording gross lesions, virological and histopathological samples were obtained from the liver of the affected birds. The virological investigation was carried out by a real-time PCR targeting the 52k gene of FAdV and microscopic investigation of liver tissue was performed after hematoxylin and eosin staining. Histopathological investigation of liver tissue showed necrotizing hepatitis with the presence of intranuclear inclusion bodies attributed to FAdV infection. The molecular assay combined with sequencing analysis of the 52k gene revealed the involvement of 19 FAdV-D and 3 FAdV-E in IBH outbreaks. The present study is indicative of a prominent involvement of FAdV-D and -E in IBH outbreaks. Due to the vastness of the country's poultry industry, the epidemiological findings of the present study in the mentioned provinces could be advantageous for the control and prevention of this disease in the country.

Keyword: Fowl adenoviruses, Inclusion body hepatitis, broilers, Iran

به پنج گونه A-E طبقه‌بندی می‌شوند. علاوه بر این، ۱۲ سروتیپ از آدنووایروس‌های ماکیان بر اساس آزمون خنثی‌سازی سرم شناخته شده است (۵). تا به امروز سروتیپ‌های مختلفی از آدنووایروس‌های ماکیان از موارد رخداد‌های طبیعی بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی جداسازی شده‌اند (۱۸).

به طور معمول، تشخیص عفونت‌های آدنووایروسی با به کارگیری ترکیبی از روش‌های ویروس‌شناسی، آسیب‌شناسی، و مولکولی صورت می‌گیرد. آزمون خنثی‌سازی سرم که در گذشته از آن به منظور تعیین سروتیپ ویروس استفاده می‌شده است، امروزه به دلیل محدودیت دسترسی آزمایشگاه‌ها به سرم‌های مرجع، به طور معمول استفاده نمی‌شود؛ این آزمون امروزه به طور موثری توسط آزمون زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) و متعاقباً سکنس توالی نوکلئوتیدی جایگزین شده است (۵). به منظور تشخیص و طبقه‌بندی آدنووایروس‌های ماکیان، چندین آزمون PCR با هدف قرار دادن یک یا ترکیبی از ژن‌های شناخته شده ویروس شامل ژن‌های هگزون، فیبر، DNA پلی‌مرز، و 52K به طور موفقیت‌آمیزی طراحی شده است (۳، ۷، ۱۲، ۱۷). در این بین، تکثیر و سکنس توالی

مقدمه

بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی، از بیماری‌های عفونی ماکیان با گسترش جهانی می‌باشد که با افزایش ناگهانی مرگ و میر و ایجاد جراحات مشخص در کبد توصیف شده است (۵). ایجاد تلفات دو تا ۱۰ درصد در جوجه‌های گوشتی سه تا هفت هفته به این بیماری نسبت داده شده است. هرچند گزارشاتی از ایجاد مرگ میر تا سی درصد و رخداد در جوجه‌های گوشتی کمتر از یک هفته نیز به ثبت رسیده است (۵). نخستین بار بیماری در سال ۱۹۶۳ مشاهده و متعاقباً به آدنووایروس‌ها نسبت داده شد (۴). در ابتدا، وجود تناقضاتی مانند همه‌جایی بودن آدنووایروس‌ها و جداسازی آن‌ها از پرندگان سالم (۱۱)، سبب ایجاد عدم قطعیت در سبب‌شناسی بیماری شده بود. بعدها، مشخص شد که تنها سروتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های مشخصی از ویروس با بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در ارتباط بوده و آدنووایروس‌های ماکیان (Fowl aviadenoviruses) به عنوان عامل ایجادکننده بیماری در نظر گرفته شدند (۱۸). آدنووایروس‌های ماکیان متعلق به جنس *Aviadenoviruses* از خانواده *Adenoviridae* می‌باشند. این ویروس‌ها بر اساس شاخص‌های مولکولی

افزایش رخداد آن در استان‌های مختلف کشور به ثبت رسیده است (۸). ۱۳، ۱۴). با این وجود، اطلاعات در دسترس در رابطه با سروتیپ و گونه آدنوویروس‌های در حال گردش در صنعت طیور کشور محدود می‌باشد (۱۳). به دلیل گستردگی جغرافیایی کشور، انجام مطالعات منطقه‌ای بر روی بیماری ضروری بنظر می‌رسید. از این رو، مطالعه حاضر به منظور گسترش اطلاعات همه‌گیرشناسی در دسترس، به ردیابی و طبقه‌بندی آدنوویروس‌های ماکیان مرتبط با رخداد‌های اخیر بیماری هپاتیت همراه

ناحیه لوپ-۱ (loop-1) از ژن هگزون و ژن کامل 52K به ترتیب سبب طبقه‌بندی آدنوویروس‌های ماکیان در سطح سروتیپ و گونه خواهد شد. سروتیپ و یا ژنوتیپ‌های در گردش آدنوویروس‌های ماکیان در نقاط جغرافیایی مختلف، متفاوت می‌باشند (۵). از این رو، به منظور طرح‌ریزی برنامه‌های کنترل و پیشگیری از بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی، ردیابی و طبقه‌بندی آدنوویروس‌های مسبب بیماری در کشور ضروری می‌باشد. بعد از اولین گزارش رسمی بیماری در کشور (۶)، شواهد متعددی از

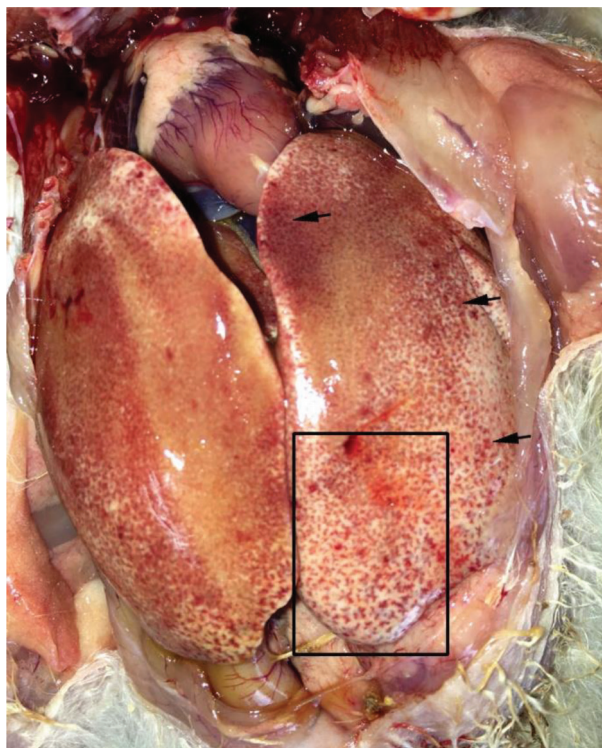
جدول ۱- اطلاعات مربوط به تاریخچه مزارع گوشتی درگیر به همراه نتایج بررسی های مولکولی.

گله	تاریخ	استان	سن (روز)	میزان تلفات (%)	آزمون PCR در لحظه (ژن 52K)	نتایج سکانس (نوع گونه)
۱	۱۳۹۶	فارس	۲۱	۴,۵	+	گونه D
۲	۱۳۹۶	فارس	۱۸	۴	+	گونه D
۳	۱۳۹۶	فارس	۱۴	۵	+	گونه D
۴	۱۳۹۶	مازندران	۷	۷,۵	+	گونه D
۵	۱۳۹۶	مازندران	۳۰	۳	+	گونه D
۶	۱۳۹۶	مازندران	۲۷	۲,۵	+	گونه D
۷	۱۳۹۶	مازندران	۳۰	۳,۶	+	گونه D
۸	۱۳۹۷	مازندران	۸	۱۲	+	گونه D
۹	۱۳۹۷	مازندران	۹	۴,۵	+	گونه D
۱۰	۱۳۹۷	مازندران	۸	۳,۵	+	گونه D
۱۱	۱۳۹۷	مازندران	۳۶	۲,۸	+	گونه E
۱۲	۱۳۹۷	تهران	۱۵	۵,۵	+	گونه D
۱۳	۱۳۹۷	مازندران	۷	۶	+	گونه D
۱۴	۱۳۹۷	تهران	۱۲	۵,۶	+	گونه E
۱۵	۱۳۹۷	مازندران	۳۰	۳,۸	+	گونه D
۱۶	۱۳۹۷	مازندران	۱۴	۴,۵	+	گونه D
۱۷	۱۳۹۸	مازندران	۱۲	۶	+	گونه D
۱۸	۱۳۹۸	فارس	۱۲	۴,۵	+	گونه D
۱۹	۱۳۹۸	مازندران	۴۲	۳	+	گونه E
۲۰	۱۳۹۸	مازندران	۱۵	۵	+	گونه D
۲۱	۱۳۹۸	مازندران	۲۱	۳,۷	+	گونه D
۲۲	۱۳۹۸	مازندران	۱۹	۶	+	گونه D

نتایج

مشاهدات کالبدگشایی حاکی از وجود جراحات مشخص در کبد پرندگان بیمار بود. کبد بزرگ، متورم، رنگ پریده، دارای نواحی خالدار سفید به همراه خونریزی‌های سر سوزنی از ثابت‌ترین یافته‌های کالبدگشایی در پرندگان بیمار بود (شکل ۱). در تعدادی از پرندگان مزارع بیمار، رنگ پریدگی بافت کلیه همراه با خونریزی‌های سرسوزنی مشاهده شد. بررسی‌های میکروسکوپی بافت کبد نشان از نکروز وسیع سلول‌های کبدی به همراه ارتشاح سلول‌های التهابی داشت. همچنین، گنجیدگی‌های منتسب به آدنوویروس‌های ماکیان در هسته سلول‌های کبدی حضور داشت (شکل ۲).

نتایج بررسی‌های مولکولی و سکانس توالی نوکلئوتیدی در جدول یک آورده شده است. آزمون PCR در لحظه، قادر به ردیابی ژن هدف در تمامی ۲۲ نمونه بافتی کبد بود (شکل ۳). نتایج سکانس توالی نوکلئوتیدی ژن 52K تاکید بر ردیابی ۱۹ آدنوویروس ماکیان گونه D و سه آدنوویروس ماکیان گونه E از رخدادهای بیماری هیپاتیت همراه با گنجیدگی در کشور داشت. بر اساس آنالیز فیلوژنی ژن 52K، آدنوویروس‌های گونه D ردیابی شده در مطالعه حاضر به همراه سویه‌های مرجع SR49، A-2A، 685، و SR48 در شاخه متعلق به گونه D و آدنوویروس‌های گونه E ردیابی شده



شکل ۱- جراحات کالبد گشایی مرتبط با رخدادهای بیماری تورم کبد همراه با گنجیدگی. کبد بزرگ شده با ظاهر مرمی سفید-قرمز (قاب مستطیل) توام با خونریزی پتشی (پیکان‌ها).

با گنجیدگی در مزارع مرغ گوشتی استان‌های مازندران، فارس، و تهران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۲ مزرعه گوشتی با تشخیص اولیه بیماری هیپاتیت همراه با گنجیدگی بر اساس یافته‌های کالبدگشایی (تورم و خونریزی بافت کبد) در بازه زمانی سه ساله از سال ۱۳۹۶ تا پایان سال ۱۳۹۸ ثبت شد. مزارع گوشتی بررسی شده با سنین هفت تا ۴۲ روزگی بودند (جدول ۱). در مرحله کالبدگشایی، بعد از ثبت یافته‌ها، به منظور بررسی‌های آسیب‌شناسی قطعه‌ای از بافت کبد پرندگان تلف شده (۲-۳ پرنده به صورت تصادفی) در ظروف حاوی فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد و در دمای اتاق نگهداری شد. همچنین، جهت ردیابی و طبقه‌بندی مولکولی آدنوویروس‌های دخیل در رخدادهای بیماری، نمونه‌های بافت کبد به صورت جداگانه اخذ و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش ذخیره شد.

بعد از تثبیت بافت کبد در فرمالین ۱۰٪، نواحی مورد نظر جهت بررسی برش داده شده و مراحل آبگیری (Dehydration)، شفاف‌سازی (Clearing) و آغشتگی (Embedding) انجام شد. پس از قالب‌گیری (Blocking)، بلوک‌های پارافینی توسط دستگاه میکروتوم (MicromLaborgeräte GmbH, Walldorf, Germany) با ضخامت ۵ میکرون برش داده شد. سپس مقاطع بافتی بر روی اسلاید قرار داده شده و رنگ‌آمیزی هماتوکسلین اتوزین انجام شد.

جهت استخراج DNA، ۲۵ میلی‌گرم از بافت کبد منجمد با استفاده از کیت استخراج (DNeasy Blood & Tissue Kit Qiagen, Hilden, Germany) و بر اساس دستورالعمل تولیدکننده مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ردیابی و طبقه‌بندی آدنوویروس‌های ماکیان، آزمون PCR زمان حقیقی با هدف تکثیر ژن 52K آدنوویروس‌های ماکیان بر طبق پروتکل گونش و همکاران استفاده شد (۳). آزمون فوق در دستگاه ترموسایکلر (Rotor-Gene Q thermal cycler, Qiagen) و با استفاده از رنگ اتصال شونده به DNA دو رشته‌ای و با کیت (Rotor-Gene SYBR Green PCR kit, Qiagen) انجام پذیرفت. به منظور تایید اختصاصیت تکثیر، بعد از پایان آزمایش منحنی ذوب (Melting curve) رسم و باند هدف بعد از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز آشکار سازی شد. سپس محصول PCR با اندازه ۱۷۶ bp، برش داده شده و با استفاده از کیت استخراج از ژل آگاروز (QIAquick gel extraction kit, Qiagen) تخلیص، و به شرکت ارائه‌دهنده خدمات سکانس (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germany) ارسال گشت. سرهم کردن و هم ترازای نوکلئوتیدها با استفاده از بسته نرم‌افزاری لیزرژن (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) صورت پذیرفت. هم‌ترازی سکانس‌های توالی نوکلئوتیدی با استفاده از روش CLUSTAL W انجام و درخت فیلوژنی با روش Neighbour-Joining (NJ) ترسیم شد. آنالیز ژن 52K با مقایسه سکانس‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در این مطالعه با سکانس‌های موجود در بانک ژن (GenBank) انجام پذیرفت.

در مطالعه حاضر در کنار سویه های مرجع CR1190 YR36، TR59 و 764 در شاخه متعلق به گونه E قرار گرفته اند (شکل ۴).

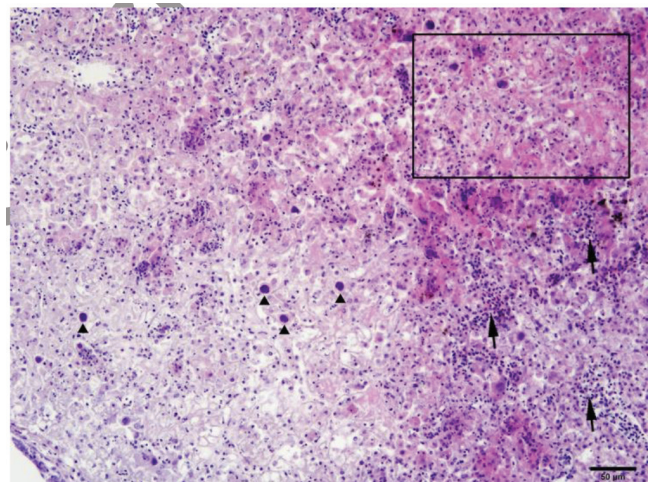
بحث

آدنووایروس‌ها از عوامل عفونی با گستره جهانی می‌باشند. در این میان، آدنووایروس‌های ماکیان مرتبط با بیماری‌های هپاتیت همراه با گنجیدگی، سندرم هپاتیت-آب آوردگی قلب، و جراحات سنگدان از اهمیت بالایی در صنعت طیور جهانی برخوردار هستند (۵). ویژگی‌های خاص سبب‌شناسی این خانواده از ویروس‌ها سبب اهمیت بحث طبقه‌بندی آدنووایروس‌های دخیل در ایجاد بیماری‌های نام برده در مناطق جغرافیایی با صنعت طیور گسترده شده است؛ همه‌جایی بودن ویروس، الگوی‌های مختلف پراکندگی جغرافیایی، حدت متفاوت و میزان پایین ایمنی متقاطع در بین سروتیپ‌های مختلف، شماری از ویژگی‌های سبب‌شناسی مرتبط با این ویروس‌ها می‌باشند که تاکید بر ضرورت انجام طبقه‌بندی آدنووایروس‌های مسبب رخداد‌های بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در کشور دارند. در رابطه با طبقه‌بندی آدنووایروس‌های ماکیان، اصطلاحات سروتیپ، ژنوتیپ و گونه تعریف شده است. در گذشته از آزمون خنثی‌سازی سرم جهت طبقه‌بندی آدنووایروس‌های ماکیان به ۱۲ سروتیپ استفاده می‌شده است (۱۱). در کنار تفریق سرمی، روش‌های مولکولی با استفاده از آنالیز آنزیم‌های محدودکننده ژنوم کامل آدنووایروس‌های ماکیان، توانست آنها را به پنج الگو محدود کننده (A-E) تقسیم کند (۲۰). این یافته‌های اولیه (۱۲) سروتیپ بر اساس آزمون خنثی‌سازی سرم و پنج گروه بر اساس آنالیز

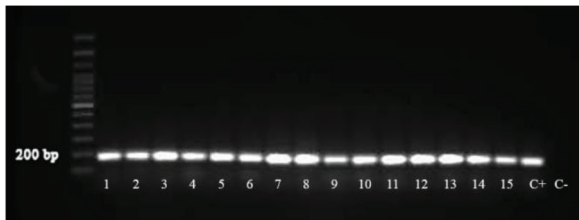
آنزیم‌های محدودکننده)، بعدها با انجام آنالیز سکانس توالی نوکلئوتیدی ناحیه لوپ یک از ژن هگزون آدنووایروس‌های ماکیان تاییدگشت و متعاقباً آستانه قرابت ۷۲٪ جهت طبقه‌بندی مولکولی آدنووایروس‌های ماکیان به پنج گونه A-E و آستانه قرابت ۹۵٪ جهت طبقه‌بندی آنها به ۱۲ ژنوتیپ با همخوانی بالا با ۱۲ سروتیپ سابق، ارائه گشت (۱۰). علاوه بر این، در سال‌های اخیر نشان داده شده است که آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن 52K قادر به تفکیک آدنووایروس‌های ماکیان در سطح گونه می‌باشد (۳). در مطالعه حاضر، نمونه‌های اخذ شده از ۲۲ رخداد بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در کشور از نظر مولکولی و آسیب‌شناسی مورد بررسی قرار گرفته و متعاقباً آدنووایروس‌های ردیابی شده بر اساس آنالیز ژن 52K در سطح گونه طبقه‌بندی شده‌اند.

تاریخچه مزارع درگیر نشان می‌دهد که بیماری در جوجه‌های گوشتی با سن یک هفته تا ۴۲ روز رخ داده است. تنها شش رخداد از ۲۲ رخداد بیماری در جوجه‌های بالاتر از سن سه هفته ثبت گشته است. اطلاعات حاضر، همخوان با مطالعه مرشد و همکاران (۱۳) می‌باشد که در آن ۲۱ رخداد از ۲۴ رخداد ثبت شده از بیماری در مزارع زیر سن سه هفته ثبت شده است. چنین یافته‌های نشان از شروع عفونت به آدنووایروس‌های ماکیان در سنین پایین و یا احتمال انتقال عمودی ویروس از مزارع مادر دارد. میزان تلفات، علایم بالینی، جراحات ماکروسکوپی و میکروسکوپی ثبت شده در مطالعه حاضر با جراحات پیشین توصیف شده برای بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی همخوانی داشته است (۵).

طبقه‌بندی آدنووایروس‌های ردیابی شده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که به طور غالب گونه D (۱۹ رخداد) و پس از آن گونه E (سه رخداد) در ارتباط با رخداد‌های بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی می‌باشد. این یافته با گزارش‌های پیشین ثبت شده از این بیماری در کشور همخوانی دارد (۱۳، ۱۴، ۶). اولین گزارش موردی از گونه D و E آدنووایروس‌های ماکیان به ترتیب در سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ توسط حسینی و مرشد (۶) و ناطقی و همکاران (۱۴) ارائه شد. اولین مطالعه جامع صورت گرفته بر روی موارد رخداد بیماری در کشور، توسط مرشد و همکاران (۱۳) با بررسی ۲۴ رخداد بیماری در ۷ استان کشور (شامل استان‌های با تعداد بالای مزارع گوشتی مانند مازندران، گیلان و گلستان) تاکید بر نقش



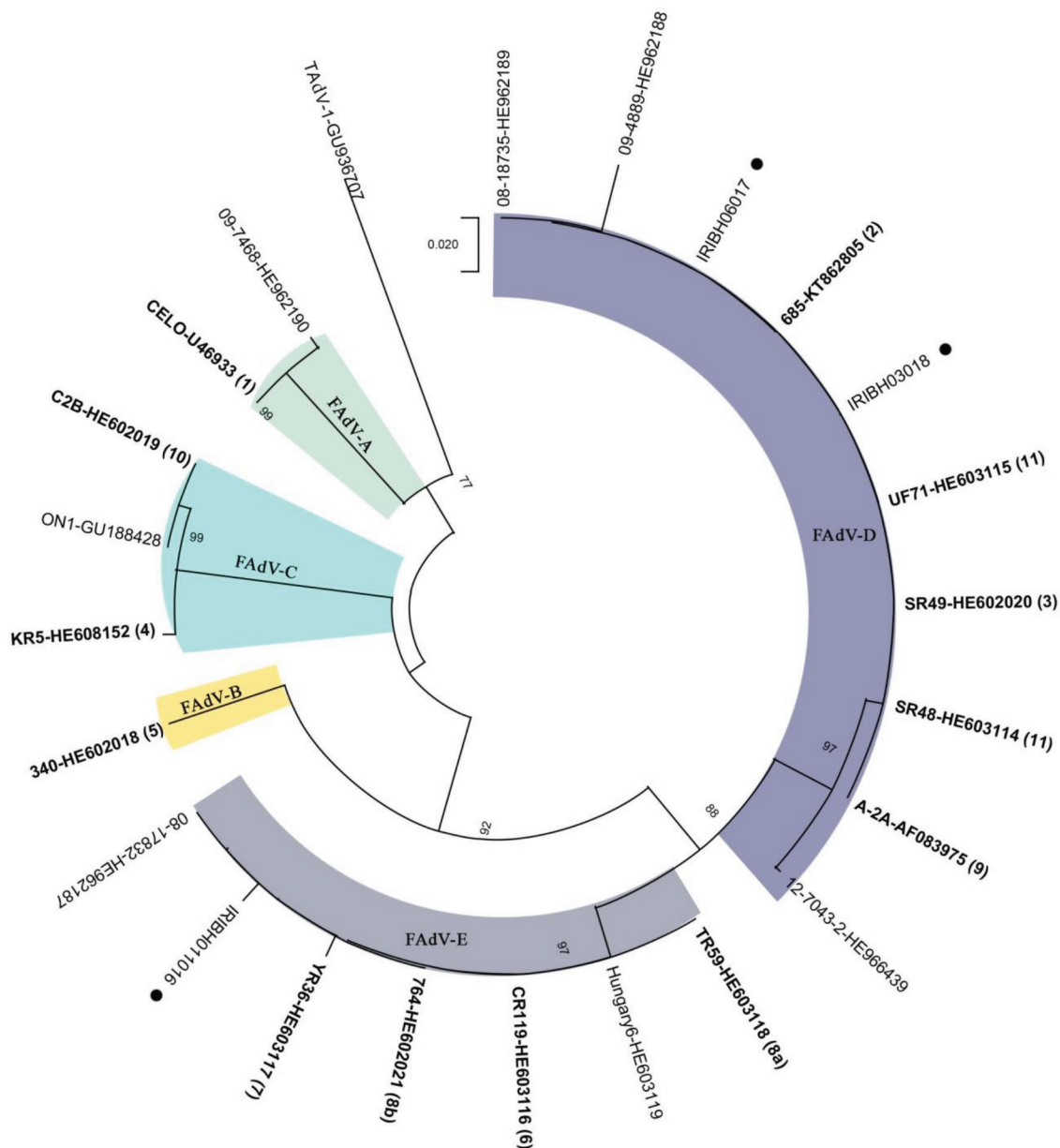
شکل ۲- آسیب شناسی کبد پرند درگیر با بیماری تورم کبد همراه با گنجیدگی. ناحیه نکروز یافت کبد با از هم پاشیدگی طناب کبدی و از بین رفتن هپاتوسیت‌ها (منتشر در تمام تصویر)، به جای ماندن بقایای اتوزینوفیلیک (قاب مستطیل) و تجمع سلول‌های التهابی (پیکان‌ها) مشخص است. گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای بزرگ و بازوفیلیک مرتبط با آدنووایروس‌های ماکیان در تصویر مشخص است (نوکلئیک پیکان‌ها). رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین. خط‌کش: ۵۰ میکرون.



شکل ۳- ظاهر سازی محصول آزمون PCR در زمان حقیقی بر روی ژن 52K آدنووایروس‌های ماکیان. ستون‌های ۱-۱۵ مربوط به نمونه‌های بالینی می‌باشند. اندازه باند هدف ۱۷۶ جفت باز (نشانهگر DNA در اندازه ۲۰۰ جفت باز مشخص شده است). نمونه‌های کنترل مثبت (C+) و کنترل منفی (C-) در دو ستون انتهایی قرار دارند.

شده ۱۰ گونه E و ۶ گونه D از آدنووایروس‌های ماکیان شناسایی شد (۱). همچنین برومند و همکاران (۲) با بررسی موارد رخداد بیماری در استان‌های مرکزی و قم اشاره به نقش برابر گونه‌های D و E در ایجاد

غالب گونه D (۱۸ نمونه مثبت) و به دنبال آن گونه E (۶ نمونه مثبت) در موارد رخداد بیماری داشته است. در مطالعه اخیر صورت گرفته بر روی موارد رخداد بیماری در استان گلستان، از ۱۶ نمونه مثبت بررسی



شکل ۴ - درخت فیلوژنی بر اساس ژن ۵۲K آدنووایروس‌های ماکیان. جهت ترسیم درخت از توالی نوکلئوتیدی ژن ۵۲K آدنووایروس بوقلمون (TAdV-1) و سروتیپ‌های دوازده‌گانه آدنووایروس‌های ماکیان استفاده شده است. نماینده آدنووایروس‌های ماکیان ردیابی شده در مطالعه حاضر با دایره‌های مشکی مشخص شده‌اند. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده شماره سروتیپ ویروس‌های مرجع (نشان داده شده با فونت ضخیم) می‌باشد. نواحی مرتبط با گونه‌های پنج‌گانه آدنووایروس‌های ماکیان (E to FAdV-A) با کادر رنگی مشخص شده است.

erinaria Hungarica 59: 279-285.

8- Khodakaram-Tafti, A., K. Asasi and F. Namazi. 2016. Clinico-pathological characteristics of acute inclusion body hepatitis outbreak in broiler chickens in Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 19: 163-168.

9- Lim, T. H., H. J. Lee, D. H. Lee, Y. N. Lee, J. K. Park, H. N. Youn, M. S. Kim, H. S. Youn, J. B. Lee, S. Y. Park, I. S. Choi and C. S. Song. 2011. Identification and virulence characterization of fowl adenoviruses in Korea. *Avian diseases* 55: 554-560.

10- Marek, A., A. Günes, E. Schulz and M. Hess. 2010. Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region. *Journal of virological methods* 170 : 147-154.

11- McFerran, J. B and J. A. Smyth. 2000. Avian adenoviruses. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 19: 589-598.

12- Meulemans, G., M. Boschmans, T. P. Van den Berg and M. Decaesstecker. 2001. Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathology* 30: 655-660.

13- Morshed, R., H. Hosseini, A. G. Langeroudi, M. H. B. Fard and S. Charkhkar. 2017. Fowl adenoviruses D and E cause inclusion body hepatitis outbreaks in broiler and broiler breeder pullet flocks. *Avian diseases* 61: 205-210.

14- Nateghi, E., J. Razmyar and M. R. Bassami. 2014. Molecular characterization of avian adenoviruses in Iranian broiler flocks. *Iranian Journal of Veterinary Research* 15: 164-167.

15- Oliver-Ferrando, S., R. Dolz, C. Calderón, R. Valle, R. Rivas, M. Pérez, M. Biarnés, A. Blanco, K. Bertran, A. Ramis and N. Busquets. 2017. Epidemiological and pathological investigation of fowl aviadenovirus serotypes 8b and 11 isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Spain (2011–2013). *Avian pathology* 46: 157-165.

16- Şahindokuyucu, İ., F. Çöven, H. Kılıç, Ö. Yılmaz, M. Kars, Ö. Yazıcıoğlu and E. Ertunç. 2020. First report of fowl aviadenovirus serotypes FAdV-8b and FAdV-11 associated with inclusion body hepatitis in commercial broiler and broiler-breeder flocks in Turkey. *Archives of virology* 165: 43-51.

17- Schachner, A., A. Marek, B. Grafl and M. Hess. 2016. Detailed molecular analyses of the hexon loop-1 and fibers of fowl aviadenoviruses reveal new insights into the antigenic relationship and confirm that specific genotypes are involved in field outbreaks of inclusion body hepatitis. *Veterinary microbiology* 186: 13-20.

18- Schachner, A., M. Matos, B. Grafl and M. Hess. 2018. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control—a re-

بیماری داشته‌اند. نتایج مطالعه حاضر همخوان با سه مطالعه نامبرده نشان می‌دهد در حال حاضر گونه D و E آدنوویروس‌های ماکیان از عوامل اصلی رخداد بیماری هپاتیت به همراه گنجیدگی در مزارع طیور استان‌های مازندران، فارس، و تهران می‌باشند. چنین الگویی از دخالت دو گونه D و E در ارتباط با بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در مناطق جغرافیایی مختلف دنیا گزارش شده است (۱۹،۱۶،۱۵،۹). اگرچه دو گونه نامبرده به عنوان اصلی‌ترین عوامل ایجادکننده بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در دنیا شناخته شده‌اند، سطوح پایینی از ایمنی متقاطع بین ویروس‌های متعلق به این دو گونه وجود دارد (۱۸). نکته مطرح شده در راستای طرح‌ریزی و اجرای برنامه‌های کنترل و پیشگیری از بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در صنعت طیور کشور حائز اهمیت می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، در دوره زمانی این مطالعه گونه‌های D و E آدنوویروس‌های ماکیان از عوامل اصلی ایجادکننده بیماری هپاتیت همراه با گنجیدگی در صنعت طیور استان‌های مازندران، فارس، و تهران می‌باشند. یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های آینده در جهت کنترل و پیشگیری بیماری فوق در مزارع پرورشی صنعتی طیور مفید واقع شود.

منابع مورد استفاده

- 1- Arazi, S., M. Mayahi, F. Talazadeh, Z. Boroomand and R. A. Jafari. 2020. Molecular identification of aviadenoviruses in broiler chickens suspected to inclusion body hepatitis in Golestan province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 21: 198.
2. Boroomand, Z., M. Mayahi, A. Rezaie and M. Ghorbani. 2020. Molecular detection of Fowl adenoviruses in broiler chickens suspected of inclusion body hepatitis in Markazi and Qom provinces, Iran. *Veterinary Research and Biological Products* 129: 2-9.
- 3- Günes, A., A. Marek, B. Grafl, E. Berger and M. Hess. 2012. Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *Journal of virological methods* 183: 147-153.
- 4- Helmboldt, C. F., and M. N. Frazier. 1963. Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance. *Avian diseases* 7: 446-450.
- 5- Hess, M. 2020. Aviadenovirus infections. pp. 322–332. In: *Diseases of Poultry*, D.E. Swayne, M. Boulianne, C. M. Logue, L. R. McDougald, V. Nair and D. L. Suarez (Eds.). Wiley-Blackwell: Ames.
- 6- Hosseini, H and R. Morshed. 2012. Molecular identification of fowl adenovirus associated with inclusion body hepatitis in Iran. *Iranian Journal of virology* 6: 7-12.
- 7- Kaján, G., S. Sameti and M. Benkő. 2011. Partial sequence of the DNA-dependent DNA polymerase gene of fowl adenoviruses: a reference panel for a general diagnostic PCR in poultry. *Acta Vet-*

view on the current global situation. *Avian pathology* 47: 111-126.
19- Steer, P. A., D. O'rourke, S. A. Ghorashi and A. H. Noormohammadi. 2011. Application of high-resolution melting curve analysis for typing of fowl adenoviruses in field cases of inclusion body

hepatitis. *Australian veterinary journal* 89: 184-192.

20- Zsák, L and J. Kisary. 1984. Grouping of fowl adenoviruses based upon the restriction patterns of DNA generated by BamHI and HindIII. *Intervirology* 22: 110-114.

