




## ردیابی و شجره شناسی ویروس انسفالومیت طیور: مطالعه یک مورد بالینی وارداتی

حسین حسینی<sup>۱</sup>، زهرا ضیافتی کافی<sup>۲</sup>، سروش سرمدی<sup>۲</sup>، فهمیه جمیری<sup>۲</sup>، علیرضا بخشی<sup>۲</sup>، نازنین سرویان<sup>۲</sup>، امید اقبالی<sup>۲</sup>، آرش قلیان چی لنگرودی\*

۱- گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.  
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۰۱ مهر ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۷ دی ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۸ دی ۱۴۰۳

 10.22034/nfvm.2025.479736.1257

### چکیده

آنسفالومیلیت پرندگان (AE) یک بیماری عفونی است که توسط ویروس آنسفالومیلیت پرندگان (AEV) ایجاد می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر نمونه‌هایی از بافت مغز از یک گله جوجه‌های گوشتی ۱۲ روزه (وارداتی از ترکیه) در مزارع استان مازندران که علائم عصبی حاکی از آنسفالومیلیت پرندگان از جمله آتاکسی، لرزش متناوب، لرزش سر و گردن، ضعف در پاها و فلجی را نشان می‌دادند جمع‌آوری شد. پس از انجام آزمایش مولکولی، توالی ژن VP2 مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه، سویه 2023-PCRLAB-UT بیشترین شباهت را (۹۹/۶۵ درصد) با سویه ZCHP2/0912 از کشور لهستان و سویه USP-BR-463-4 از کشور برزیل نشان داد. همچنین بررسی‌های بیشتر، شباهت بالایی (۹۹/۲۹ درصد) را بین سویه‌ی مطالعه‌ی حاضر با برخی از سویه‌های واکسن ثبت شده در بانک ژن نشان داد. نتایج این مطالعه اولین مورد ورود AEV از طریق ورود یک گله آلوده به کشور را نشان می‌دهد و اهمیت انجام بررسی‌های اپیدمیولوژیک منظم و پایش مستمر پرندگان وارداتی را برجسته می‌کند. همچنین، با توجه به شباهت ژنتیکی بین جدایه‌ی این مطالعه و برخی سویه‌های واکسن ثبت شده در بانک ژن، ضرورت نظارت دقیق‌تر بر اثربخشی واکسیناسیون و پایش پس از آن مشخص می‌شود. یافته‌ها می‌توانند به درک بهتر مکانیسم‌های احتمالی انتقال ویروس‌های زنده واکسن و تاثیر آن بر سلامت گله‌های طیور کمک کرده و لزوم تقویت نظارت بر منشأ گله‌های وارداتی را مورد تاکید قرار دهند.

**واژگان کلیدی:** آنسفالومیلیت پرندگان، ماکیان، واکسن، فیلوژنی

## مقدمه

بیماری انسفالومیلیت پرندگان یک بیماری عفونی است که توسط ویروس انسفالومیلیت پرندگان (AEV) ایجاد می‌شود. میزبانان مستعد این ویروس شامل ماکیان، قرقاول، بوقلمون و بلدرچین بوده که از این بین، ماکیان بیشترین حساسیت را دارند (۱). این بیماری اولین بار در سال ۱۹۳۰ توسط جونز در آمریکا توصیف شد (۲). این بیماری در ماکیان جوان با علائم عصبی از جمله آتاکسی، فلجی نسبی (پارزی) و لرزش‌های سر و گردن بروز یافته و نرخ شیوع بالا و نرخ مرگ و میر متغیر دارد. اما در ماکیان بالغ بیماری اگرچه با کاهش موقت تولید تخم‌مرغ و قابلیت هج شدن آن همراه است اما معمولاً به‌صورت تحت بالینی بروز می‌یابد (۳). میانگین نرخ مرگ و میر بیماری ۲۵ درصد بوده که می‌تواند تا ۵۰ درصد نیز افزایش یابد (۴). ویروس انسفالومیلیت پرندگان عضوی از خانواده‌ی پیکورناویریده بوده و واجد یک قطعه ژنوم RNAی کوتاه تک‌رشته‌ی سنس مثبت می‌باشد. طول ژنوم ۷ کیلوباز بوده که یک پلی‌پروتئین بزرگ را کد می‌کند. بخش P1 ژن ویروس کدکننده‌ی چهار پروتئین ساختاری (VP-1، VP-2، VP-3، VP-4) و بخش‌های P2 و P3 کدکننده‌ی پنج پروتئین غیر ساختاری هستند (۵). ویروس می‌تواند به‌صورت افقی و از مسیر مدفوعی-دهانی انتقال یابد و در سلول‌های پوششی روده و عمدتاً در دوازدهه تکثیر یابد. ویروس همچنین می‌تواند متعاقباً تکثیر یافته و ایجاد ویرمی کند و به اندام‌های مختلف مانند پیش‌معدة، سنگدان، کبد، کلیه‌ها، طحال و قلب انتشار یابد (۴). انتقال ویروس همچنین می‌تواند به‌صورت عمودی از مادر تخم‌گذار آلوده از راه تخم‌مرغ به جوجه صورت بگیرد، که سبب بروز بیماری و علائم بالینی در نتاج می‌گردد (۶). تشخیص می‌تواند بر اساس ویژگی‌های بالینی و هیستوپاتولوژیک و تأیید تشخیص با رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس صورت گیرد. همچنین می‌توان از کشت ویروس در کیسه‌ی زرده، الایزا، تست‌های سرمی و

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس (RT-PCR) در تشخیص بیماری کمک گرفت (۷). بهترین راه برای کنترل و پیشگیری از بیماری واکسیناسیون گله‌های مادر در طی دوره‌ی grow-out، پیشگیری از عفونت در مادرها و به دنبال آن انتقال ویروس به جوجه‌ها است. علاوه بر این، واکسیناسیون مادرها ایمنی خوبی برای جوجه‌ها ایجاد می‌کند که موجب اطمینان از حفاظت آنها در برابر عفونت با ویروس در طی هفته‌های اول زندگی می‌شود (۸). اگرچه واکسیناسیون ابزار مهم و کلیدی در پیشگیری از این بیماری است اما، مواردی از بروز بیماری مرتبط با واکسن در گذشته گزارش شده است. در موردی از ایالات متحده، Senties-Cué و همکاران در سال ۲۰۱۶ رخداد بیماری انسفالیت پرندگان را در بین پولت‌های تخم‌گذار Leghorn، به دنبال واکسیناسیون گزارش کردند (۹). همچنین در مطالعه‌ی قدیمی‌تر، Glisson و همکاران در سال ۱۹۸۶، رخداد انسفالومیلیت را در مدت ۲ هفته پس از واکسیناسیون در پولت‌های مادر گوشتی گزارش کردند (۱۰). وجود گزارش‌هایی از رخداد بیماری پس از واکسیناسیون، نشان‌دهنده اهمیت پایش گله‌ها پس از انجام واکسیناسیون و همچنین پایش مداوم عملکرد و کارایی واکسن‌های مصرفی می‌باشد. از آنجایی که شیوع این بیماری در کشور می‌تواند سبب وارد آمدن خسارات اقتصادی گردد، بررسی شیوع و اپیدیمولوژی این بیماری در بین پرندگان در داخل کشور و همچنین پرندگان وارداتی به کشور از اهمیت ویژه‌ی برخوردار است. ورود پرندگان بیمار به داخل کشور می‌تواند سبب بروز همه‌گیری‌های مختلف و متعاقباً ورود خسارات اقتصادی و بهداشتی شود، بنابراین پایش مداوم پرندگان وارداتی امری ضروری در پیشگیری از شیوع بیماری‌های مختلف می‌باشد. هدف از این مطالعه گزارش شناسایی و بررسی فیلوژنتیک ویروس انسفالومیلیت پرندگان در ماکیان گوشتی نژاد راس وارد شده از کشور ترکیه می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**جمع آوری نمونه:** تعداد ۱۰ نمونه بافت مغز از گله جوجه‌های گوشتی ۱۲ روزه نژاد راس (وارداتی از کشور ترکیه) در مزارع استان مازندران با سابقه علائم عصبی مشکوک به بیماری AE از جمله آتاکسی، لرزش متناوب سر و گردن، ضعف در پاها و فلجی، برای انجام آزمون PCR جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها همراه با یخ به آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل و تا زمان آزمایش در فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند.

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** بافت‌های جمع‌آوری شده با استفاده از PBS استریل هموژن شدند و پس از آن محتوای RNA هموژن‌های تهیه شده با استفاده از کیت استخراج RNA Sina-pure (شرکت سیناکلون- ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. RNA استخراج شده در حجم  $50\mu\text{l}$  از Elution buffer رهاسازی و تا مرحله سنتز cDNA در فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. جهت ساخت cDNA در ابتدا میزان  $10\mu\text{l}$  از RNA استخراج شده با میزان  $1\mu\text{l}$  رندوم هگزامر مخلوط شده و در مرحله اول به مدت ۵ دقیقه در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  و ۱ دقیقه در دمای  $5^{\circ}\text{C}$  قرار

## ردیابی و شجره‌شناسی ویروس انسفالومیت پرنندگان

گرفتند. در مرحله دوم مقادیر  $4\mu\text{l}$  بافر آنزیم ریورس ترانسکریپتاز،  $2\mu\text{l}$  dNTP،  $2\mu\text{l}$  آب مقطر استریل و  $1\mu\text{l}$  آنزیم ریورس ترانسکریپتاز به محصول مرحله افزوده شد و سپس برای مدت ۵ دقیقه در دمای  $25^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای  $42^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۵ دقیقه در دمای  $85^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۱ دقیقه در دمای  $5^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند.

**PCR و توالی‌یابی:** از cDNA های به دست آمده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بخشی از ژن VP2 و ناحیه 5'-UTR (جدول ۱) آزمون PCR انجام شد. برای انجام واکنش PCR میزان  $12.5\mu\text{l}$  مسترمیکس PCR 2X شرکت مکسل،  $8\mu\text{l}$  آب مقطر استریل،  $1\mu\text{l}$  از هر یک از پرایمرها و  $2.5\mu\text{l}$  cDNA تولید شده مخلوط شدند و طبق برنامه  $^{\circ}\text{C}$  ۹۵ به مدت ۳ دقیقه،  $^{\circ}\text{C}$  ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون با دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال  $^{\circ}\text{C}$  ۵۶ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طول‌سازی  $^{\circ}\text{C}$  ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طول‌سازی نهایی با دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز  $1/5$  درصد الکتروفورز شده، با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و تحت نور UV شناسایی شدند. در نهایت محصولات PCR جهت توالی‌یابی به شرکت کدون ژنتیک ارسال شدند.

جدول ۱. پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای تکثیر و توالی‌یابی بخشی از ژن VP2 و ناحیه 5'-UTR

Primer label	sequence	Product size (bp)	Annealing temp ( $^{\circ}\text{C}$ )	Reference
5'-UTR				
AE II F	CTTTGCGTTTCACAGAACCATCC	۲۸۵	۵۶	-
AE II R	AATTGCTACCCTTAATCTCTC			
VP2 gene				
MKAE1	CTTATGCTGGCCCTGATCGT	۶۲۰	۵۶	(۱۱)
MKAE2	TCCCAAATCCACAAACCTAGCC			

ویرایش شدند و سپس هم‌ترازی با توالی‌های مرجع صورت گرفت. هم‌ترازی با استفاده از روش ClustalW موجود در

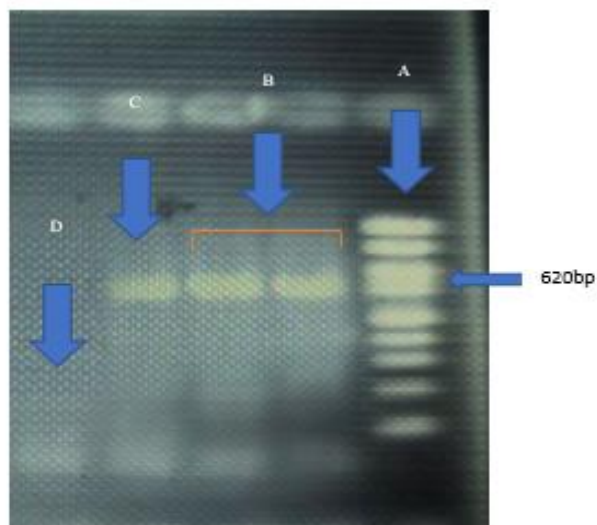
**آنالیز توالی:** توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از Chromas نسخه ۲,۶,۵ از نظر کیفیت خوانش‌ها بررسی و

توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی، در تصویر ۲ نشان داده شده است. درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی VP2 خوانش شده جدایه PCRLAB-UT-2023 و دیگر ایزوله‌های ویروسی شناخته‌شده نشان داد که این نمونه به‌طور برجسته با ویروس‌های Avian encephalomyelitis و Tremovirus A1 virus شباهت دارد، اما هیچ‌یک از نمونه‌ها تطابق کامل (۱۰۰ درصد) با PCRLAB-UT-2023 ندارند. علاوه بر این، این نمونه در کنار سویه‌های واکسن A vaccine، B vaccine، vaccine A\_7P و vaccine B\_7P قرار دارد که نشان‌دهنده شباهت‌های ژنتیکی بالای این نمونه با سویه‌های واکسن است. این جایگاه در درخت فیلوژنی حاکی از یک ارتباط تکاملی نزدیک میان PCRLAB-UT-2023 و سویه‌های واکسن است (تصویر ۳).

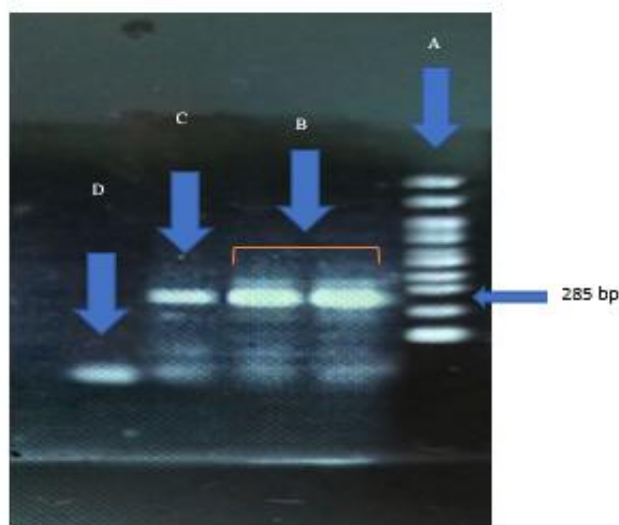
نرم‌افزار MEGA نسخه ۷ انجام شد. در این مطالعه از نرم‌افزار MEGA 7 درخت فیلوژنتیک با روش Maximum Likelihood و مدل General time reversible (GTR) با bootstrap ۱۰۰۰ ترسیم شد. همچنین آنالیز همولوژی توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با کمک نرم‌افزار MEGA نسخه ۷ انجام شد.

### نتایج

نتایج آزمون PCR حضور ژنوم ویروس انسفالومیلیت پرندگان را در تمامی نمونه‌ها تأیید کرد. پس از تأیید آزمون PCR (تصویر ۱)، تعداد یک نمونه برای توالی‌یابی ارسال شد. توالی نوکلئوتیدی خوانش شده پس از تأیید خوانش و تأیید کیفیت در بانک ژنی با عنوان PCRLAB-UT-2023 با شماره دسترسی PP998214 ثبت گردید. نتایج هم‌ترازی بین توالی مطالعه کنونی با توالی‌های واکسن و فیلد سایر مطالعات و



ب

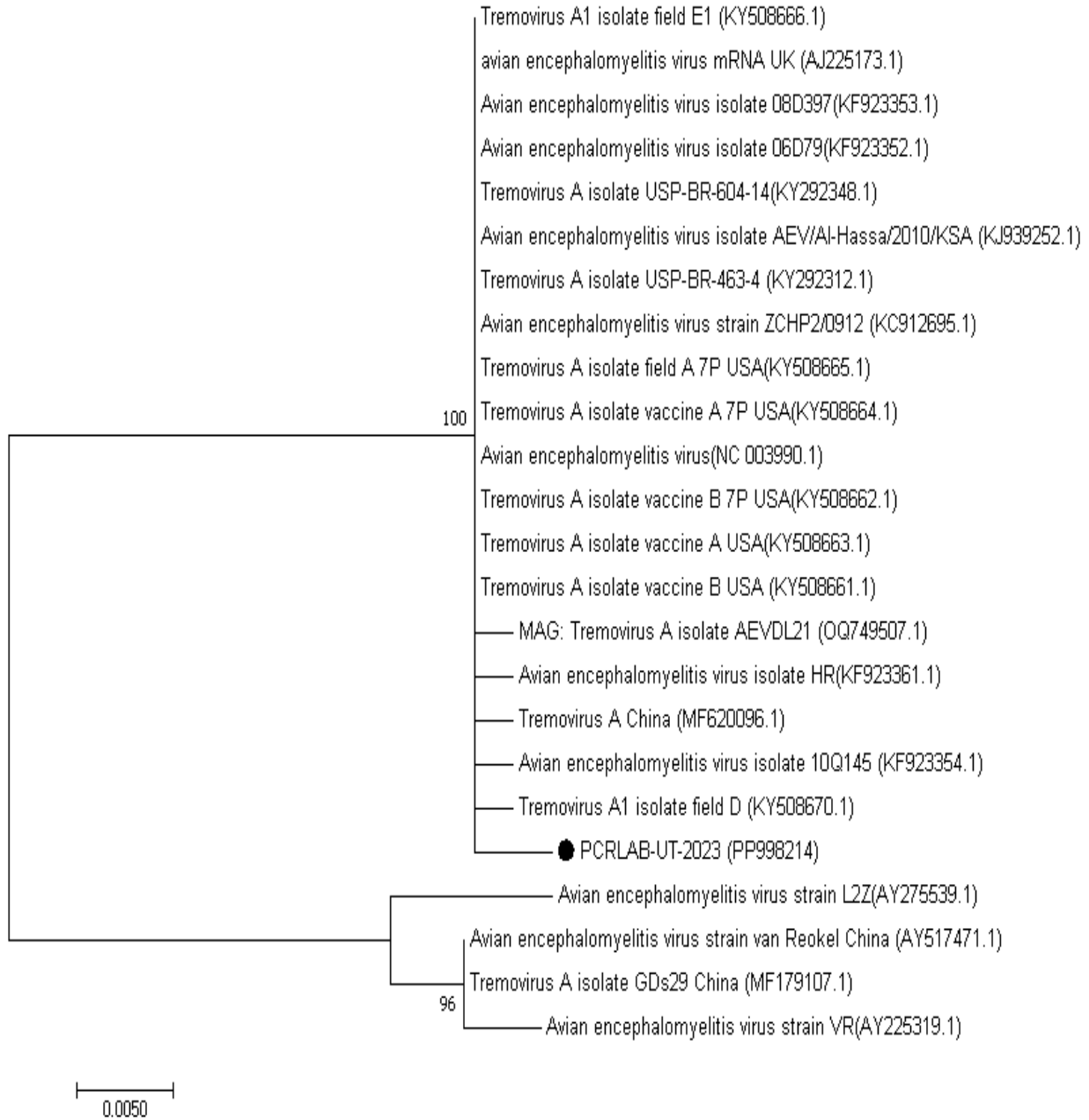


الف

تصویر ۱- نتیجه تکثیر بخشی از ناحیه ۵'-UTR (تصویر الف) و ژن VP2 (تصویر ب). A: لدر، B: نمونه‌ها، C: کنترل مثبت، D: کنترل منفی

Accession	PCRLAB-UT-2023									
	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Tremovirus_A_China_HF620096.1	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T
Avian_encephalomyelitis_virus_strain_LZZ_China_AY275539.1										
Tremovirus_A_isolate_vaccine_B_USA_KY508661.1										
Tremovirus_A_isolate_vaccine_A_USA_KY508663.1										
Tremovirus_A_isolate_vaccine_B_7P_USA_KY508662.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_NC_003990.1										
Tremovirus_A_isolate_vaccine_A_7P_USA_KY508664.1										
Tremovirus_A_isolate_field_A_7P_USA_KY508665.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_strain_van_Reekei_China_AY17471.1										
Tremovirus_A_isolate_GD28_China_HF179107.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_strain_ZCHP20912_KC812695.1										
Tremovirus_A_isolate_USP-BR-463-4_KY292312.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_isolate_AEVAI-Hassa2010KSA_KJ039252.1										
MEG7_Tremovirus_A_isolate_AEVDL21_Q0749507.1										
Tremovirus_A_isolate_USP-BR-604-14_KY292348.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_isolate_06D79JFKF23352.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_isolate_HRKF923361.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_isolate_Q0245_KF923354.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_isolate_08D397KF923353.1										
Tremovirus_A1_isolate_field_E1_KY508666.1										
Tremovirus_A1_isolate_field_D_KY508670.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_strain_van_Reekei_AY17471.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_strain_VR/AY225319.1										
Avian_encephalomyelitis_virus_strain_LZZ/AY275539.1										
avian_encephalomyelitis_virus_mRNA_UK_AJ225173.1										

تصویر ۲- همترازی توالی این مطالعه با توالی‌های واکسن و فیلد سایر مطالعات و توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی به روش Clustal W با نرم‌افزار MEGA7.



تصویر ۳- تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک مولکولی ویروس انسفالومیت طیور براساس ژن VP2 با نرم افزار مگا نسخه ی ۷ مدل Maximum likelihood و روش GTR رسم شده است. جدایی این مطالعه با دایره مشکی در درخت نشان داده شده است.

# ردیابی و شجره‌شناسی ویروس انسفالومیت پرنده‌گان

جدول ۲- میزان شباهت ژنتیکی با استفاده از مدل maximum likelihood بر روی ویروس انسفالومیت طیور جدا شده در این مطالعه و سایر ویروس‌های انسفالومیت طیور ثبت شده در بانک ژنی بر اساس ژن Vp2 محاسبه شد.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	PCRLAB-UT-2023 (PP998214)																						
2	ZCHP2/0912_(KC912695.1)	99.65																					
3	USP-BR-463-4_(KY292312.1)	99.65	100.0																				
4	06D79(KF923352.1)	99.62	100.0	100.0																			
5	field_E1_(KY508666.1)	99.61	100.0	100.0	100.0																		
6	USP-BR-604-14(KY292348.1)	99.64	100.0	100.0	100.0	100.0																	
7	AEV/AI-Hassa/2010/KSA_(KJ939252.1)	99.64	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0																
8	_HR(KF923361.1)	99.43	99.81	99.81	99.81	99.80	99.81	99.81															
9	field_D_(KY508670.1)	99.41	99.80	99.80	99.80	99.80	99.80	99.80	99.61														
10	vac-cine_B_USA_(KY508661.1)	99.29	99.65	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.81	99.80													
11	vaccine_A_USA(KY508663.1)	99.29	99.65	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.81	99.80	100.00												
12	Avian_encephalomyelitis_virus(NC_003990.1)	99.29	99.65	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.81	99.80	100.00	100.00											
13	_mRNA_UK_(AJ225173.1)	99.29	99.65	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.81	99.80	100.00	100.00	100.00										
14	field_A_7P_USA(KY508665.1)	99.29	99.64	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.81	99.80	100.00	100.00	100.00	100.00									
15	Tremovirus_A_China_(MF620096.1)	99.11	99.47	99.82	99.81	99.80	99.82	99.82	99.62	99.61	99.82	99.82	99.82	99.82	99.82								
16	AEVDL21_(OQ749507.1)	98.94	99.29	99.65	99.81	99.80	99.64	99.64	99.62	99.61	99.65	99.65	99.65	99.65	99.65	99.47							
17	GDs29_China_(MF179107.1)	94.83	94.81	95.18	95.02	95.06	95.12	95.16	94.81	94.84	95.21	95.21	95.21	95.21	95.38	95.01	94.82						
18	van_Reo-keel_China_(AY517471.1)	94.83	94.81	95.18	95.02	95.06	95.12	95.16	94.81	94.84	95.21	95.21	95.21	95.21	95.38	95.01	94.82	100.00					
19	_Reo-keel_(AY517471.1)	94.83	94.81	95.18	95.02	95.06	95.12	95.16	94.81	94.84	95.21	95.21	95.21	95.21	95.38	95.01	94.82	100.00	100.00				
20	VR (AY225319.1)	94.44	94.42	94.79	94.59	94.62	94.72	94.77	94.38	94.40	94.82	94.82	94.82	94.82	94.99	94.62	94.43	99.65	99.65	99.65			
21	L2Z_China_(AY275539.1)	94.27	94.64	95.01	94.83	94.87	94.95	94.99	94.62	94.65	95.04	95.04	95.04	95.04	95.21	94.85	94.65	98.94	98.94	98.94	98.58		

نشریه تازه‌ها در میکوبینشناسی دامپزشکی جلد ۸ / شماره ۲ / تابستان ۱۴۰۱

## بحث و نتیجه‌گیری

رخداد بیماری انسفالومیلیت در بین گله‌های پرندگان می‌تواند خسارات اقتصادی گسترده‌ای را به صنعت طیور وارد کند (۴). بروز این بیماری در بین پرندگان جوان معمولاً با بروز علائم عصبی همچون آتاکسی می‌شود درحالی که در پرندگان بالغ عموماً با بروز علائم بالینی همراه نبوده و تنها سبب کاهش موقت تخم‌گذاری و همچنین قابلیت هیچ شدن تخم‌مرغ‌ها می‌شود (۱۲). واکسیناسیون گله‌ها همچنان یکی از روش‌های مؤثر در کنترل و پیشگیری از این بیماری است (۱۳). پایش مداوم سویه‌های درگردش اهمیت ویژه‌ای در تعیین میزان کارایی واکسن‌ها و همچنین تبیین وضعیت شیوع بیماری در مناطق مختلف دارد.

در مطالعه‌ی حاضر، آنالیز فیلوژنی جدایه PCRLAB-UT-2023 را در یک خوشه در کنار جدایه‌های واکسن همچون vaccine\_A\_7P, vaccine\_B\_7P, vaccine\_A و vaccine B قرار داد که می‌تواند نشانگر شباهت این با جدایه با جدایه‌های واکسن باشد. همچنین در درخت فیلوژنی این جدایه در کنار جدایه‌های دیگری نیز از کشورهای انگلستان، عربستان، چین و لهستان قرار گرفته است. آنالیز همولوژی توالی مطالعه‌ی حاضر همچنین شباهت بالایی (۹۹/۶۵ درصد) با سویه ZHP2/0912 از کشور لهستان و سویه‌ی USP-BR-463-4 از کشور برزیل و (۹۹/۲۹ درصد) با سویه‌های واکسن vaccine\_B و vaccine\_A نشان داد.

مطالعات مختلفی در دنیا برای بررسی سویه‌های درگردش ویروس انسفالومیلیت پرندگان انجام شده است. در سال ۲۰۱۸، De la Torre و همکاران ویروس انسفالومیلیت پرندگان را از جوجه‌های گوستی برزیل به روش RT-PCR گزارش نمودند. بر اساس آنالیز فیلوژنی ژن VP2، توالی‌های گزارش شده از این مطالعه به سویه‌ی واکسینال تجاری Calnek شباهت داشت (۱۴). در مطالعه‌ی که توسط Kim و همکاران بر روی گله‌های مولد در کره جنوبی در سال ۲۰۱۵ انجام شد، ویروس

انسفالومیلیت پرندگان به روش RT-PCR با تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۱۹ جفت باز از ژن VP2، در جوجه‌های جوان کمتر از ۴ هفته که علائم بیماری AE را نشان دادند بین سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۱ ردیابی شد. همچنین در سال ۲۰۱۳ این بیماری در جوجه‌های یک‌روزه‌ی واکسینه نشده که علائم بیماری را نشان دادند ردیابی شد. بررسی‌های فیلوژنی نشان داد که این سویه‌های جدا شده به سویه‌ی واکسینال مشابه بودند (۱۵). GOTO و همکاران در مطالعه‌ی در سال ۲۰۱۹ در ژاپن، ویروس انسفالومیلیت پرندگان را در نمونه‌های مغز جوجه با استفاده از روش RT-PCR بر اساس ژن 5'UTR شناسایی کردند. بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنی انجام شده در این مطالعه، سویه‌های به‌دست آمده در دو گروه A و B تقسیم‌بندی شدند. در گروه A همچنین در برگیرنده سویه‌های جدا شده از کشورهای آمریکا و چین بوده، درحالی که در گروه B سویه‌هایی از هنگ‌کنگ و مجارستان می‌باشد (۵). در مطالعه‌ی دیگری، Haryanto و همکاران در کشور اندونزی نمونه‌های بالینی را از پرندگانی که از نظر سرمی عفونت با ویروس انسفالومیلیت پرندگان در آنها تأیید شده بود را از نظر مولکولی، با تکثیر و تجزیه و تحلیل توالی ژن VP2 مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که جدایه‌ی این مطالعه واجد ۹۲ درصد همولوژی نوکلئوتیدی در مقایسه با جدایه‌ی AV1775/07 از کشور انگلستان و ۸۵ درصد همولوژی با جدایه‌ی ZHP2/0912 از کشور لهستان داشت (۱۶). در مطالعه‌ی که توسط Al-Hamnadi و همکاران انجام شد، محققین با استفاده از روش‌های مولکولی (ردیابی ژن VP2) و بافت‌شناسی به بررسی شیوع ویروس انسفالومیلیت پرندگان در استان Al-Ahsa در کشور عربستان سعودی پرداختند. نتایج تحلیل توالی‌های به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که سویه جدا شده در استان Al-Ahsa در کشور عربستان سعودی در این مطالعه (KSA)، ارتباط نزدیکی (۹۹/۶ درصد) با سویه‌ی اروپایی جدا شده از جوجه‌ها در لهستان (ZHP2/0912) و انگلستان (Calnek) دارد. این سویه

## ردیابی و شجره‌شناسی ویروس انسفالومیت پرندگان

نشان داد که این جدایه با سویه‌های واکسن آمریکا و چین در یک دسته قرار گرفته (Cluster I) و با جدایه‌هایی از هنگ‌کنگ و مجارستان (Cluster II) تفاوت دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که منشأ این شیوع مرتبط با واکسن بوده است (۲۰). در ارتباط با بروز بیماری به دنبال واکسیناسیون، Senties-Cué و همکاران در سال ۲۰۱۶، بروز بیماری انسفالومیلیت پرندگان را در سه گله‌ی تخم‌گذار (leghorn layer pullet) در سنین ۱۱، ۱۲ و ۱۴ هفتگی، دو هفته پس از واکسیناسیون با واکسن انسفالومیلیت پرندگان و آبله گزارش کردند (۹). همچنین در مطالعه‌ی دیگری، Glisson و همکاران بروز انسفالیت را در پولات‌های مادر گوشتی و خروس‌های (Cockerels) دو شرکت مختلف، دو هفته پس از واکسیناسیون با واکسن انسفالومیلیت پرندگان گزارش کردند (۱۰). همچنین در مطالعه‌ی Smyth و همکاران بروز انسفالومیلیت پرندگان را به دنبال واکسیناسیون خوراکی در سن ۱۴ هفتگی گزارش کردند (۲۱).

مطالعه حاضر به بررسی بروز انسفالومیلیت پرندگان در یک گله جوجه گوشتی ۱۲ روزه نژاد راس وارداتی از کشور ترکیه در استان مازندران، شمال ایران پرداخته است. نتایج تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که جدایه‌ی PCRLAB-UT-2023 با برخی سویه‌های واکسن از جمله سویه‌ی Calnek (AJ225173) از کشور انگلستان و سویه‌های vaccine\_A\_7P (KY508662)، vaccine\_B\_7P (KY508663) و vaccine\_A (KY508661) از کشور ایالات متحده آمریکا در یک دسته قرار می‌گیرد. همچنین بررسی همولوژی جدایه‌ی مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که این جدایه دارای همولوژی بالایی (۹۹/۲۹ درصد) با جدایه‌های واکسینال vaccine\_A و vaccine\_B است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه به نظر می‌رسد که شیوع اخیر انسفالومیلیت پرندگان، احتمالاً ممکن است مرتبط با یک سویه‌ی واکسینال از ویروس باشد که می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت پایش گله‌ها پس از

همچنین دارای شباهت بالایی در حدود ۹۵ درصد با برخی از سویه‌های کشور چین (VR, van Reok1, LZ2) است. (۱۷). آنالیز فیلوژنی جدایه‌ی PCRLAB-UT-2023 در مطالعه‌ی حاضر، بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن VP2، این جدایه را با سویه‌هایی مانند ZCHP2/0912 از کشور لهستان، KSA از کشور عربستان سعودی، جدایه USP-4-BR-463 از کشور برزیل، جدایه‌ی 10Q145 از کشور کره جنوبی و جدایه‌های AEVDL21 و Gdt29 از کشور چین در یک دسته طبقه‌بندی کرد.

در ایران، Aghakhan و همکاران در سال ۱۹۹۴، حضور ویروس انسفالومیلیت پرندگان را در کشور گزارش کردند (۱۸). Asasi و همکاران در سال ۲۰۰۸ با بررسی بالینی و هیستوپاتولوژیک، نمونه‌های گرفته شده از ۶۰۰۰ پرندۀ از گله‌های گوشتی تجاری در اطراف شیراز وجود عفونت انسفالومیلیت پرندگان را در این منطقه نشان دادند. در این مطالعه علائمی همچون آتاکسی، لرزش گردن، و کشیدگی پاها به شکل مشخصی مشاهده شد. بررسی‌های پاتولوژیک، ضایعاتی مانند گلیوز، نفوذ لنفوسیت‌ها پیرامون عروق و دژنریشن نورون‌ها را در سیستم عصبی مرکزی نشان داد. در سیار بافت‌ها بررسی‌های پاتولوژیک نشان‌دهنده‌ی کانون‌های نفوذ لکوسیت‌ها در لایه‌ی ماهیچه‌ای سنگدان و تجمع لنفوسیت‌ها در لایه‌ی ماهیچه‌ای تحت مخاطی پیش‌معدۀ بود (۱۹). در مطالعه‌ی دیگری توسط Ghorani و همکاران، محققین با استفاده از آزمون RT-PCR (ردیابی ژن VP2) و بررسی‌های بالینی و هیستوپاتولوژیک نمونه‌های تهیه شده از گله‌های مرغ گوشتی تجاری از شهر کاشان در استان اصفهان، حضور ویروس انسفالومیلیت پرندگان را در نمونه‌های گرفته شده نشان دادند (۷). در مطالعه‌ی دیگری، Ghalyanchilageroudi و همکاران با بررسی نمونه‌های مغز تهیه شده از گله‌های مرغ گوشتی مشکوک به درگیری با انسفالومیلیت پرندگان در کرمانشاه، با استفاده از آزمون PCR، حضور ویروس انسفالومیلیت پرندگان را نشان دادند. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنی توالی مربوط به جدایه‌ی این مطالعه (UT-Marjanmehr-2021)،

پرندگان در کشور را روشن کند و بر اهمیت پایش مداوم پرندگان وارداتی تأکید داشته باشد. مطالعات بیشتری برای روشن‌سازی وضعیت اپیدمیولوژیک ویروس انسفالومیلیت پرندگان در ایران و نقش واکسیناسیون در بروز بیماری پیشنهاد می‌شود.

واکسیناسیون باشد. علاوه بر این، این تحقیق می‌تواند به درک بهتر بروز بیماری پس از واکسیناسیون کمک کرده و بر لزوم نظارت بیشتر بر روند ساخت و توسعه واکسن‌های انسفالومیلیت طیور و پایش عملکرد واکسن پس از تجویز در گله‌ها تأکید کند. همچنین، نتایج این مطالعه می‌تواند اهمیت بررسی اپیدمیولوژیک بیماری انسفالومیلیت

## References

- 1- Zhang G, Li S, Shen Z, Wang F. Progress in research on the molecular biological detection techniques of avian encephalomyelitis. *Res Vet Sci*. 2023; 159: 232-6.
- 2- Rocha PM, Barros ME, Rocha BP, Souza FD, Mendonça FD, Evêncio-Neto J. Severe outbreak of Avian encephalomyelitis in laying hens in Northeastern Brazil. *Brazilian J Poult Sci*. 2019; 21(02): eRBCA-2018.
- 3- Fan L, Li Z, Huang J, Yang Z, Xiao S, Wang X, et al. Dynamic distribution and tissue tropism of avian encephalomyelitis virus isolate XY/Q-1410 in experimentally infected Korean quail. *Arch Virol*. 2017; 162: 3447-58.
- 4- Ali MZ, Shaon MTW, Moula MM, Bary MA, Sabuj AAM, Khaled SA, et al. First report on the seroprevalence of avian encephalomyelitis virus antibody in Sonali (cross-bred) chickens in Bogura, Bangladesh. *J Adv Vet Anim Res*. 2021; 8(1): 78.
- 5- Goto Y, Yaegashi G, Kumagai Y, Ogasawara F, Goto M, Mase M. Detection of avian encephalomyelitis virus in chickens in Japan using RT-PCR. *JVMS*. 2019; 81(1): 103-6.
- 6- Yu XH, Zhao J, Qin XH, Zhang GZ. Serological evidence of avian encephalomyelitis virus infection associated with vertical transmission in chicks. *Biologicals*. 2015; 43(6): 512-4.
- 7- Ghorani M, Ghalyanchi Langeroudi A, Akramian A, Hosseini H, Rohani F. Detection of avian encephalomyelitis virus in broiler chickens in Iran using RT-PCR and histopathological methods. *Iran j virol*. 2019, 13(2): 24-8.
- 8- de FE, Back A. New occurrence of avian encephalomyelitis in broiler-is this an emerging disease? *Rev Bras Cienc*. 2015; 17(3): 399-404.
- 9- Senties-Cué CG, Gallardo RA, Reimers N, Bickford AA, Charlton BR, Shivaprasad H. Avian encephalomyelitis in layer pullets associated with vaccination. *Avian Dis*. 2016; 60(2): 511-5.
- 10- Glisson J, Fletcher O. Clinical encephalitis following avian encephalomyelitis vaccination in broiler breeder pullets. *Avian Dis*. 1987; 383-5.
- 11- Hartawan R, Dharmayanti NL. Detection of Five Virus Infections in the Layer Farm with Runting-Stunting Syndrome in Sukabumi and Tangerang Using Polymerase Chain Reaction Technique. *J Kedokt Hewan*. 2017; 11(2).
- 12- Zhang F, Luo Y, Wei Q, Xiong L, Xie Q, Tan J, et al. Research Note: Pathogenetic characteristics of avian encephalomyelitis virus in Guangdong and Jiangxi Provinces, China. *Poult Sci*. 2024; 103(2): 103264.
- 13- Lin W, Lu P, Li A, Wu Y, Li H, Chen F, et al. Assessing the efficacy of a live vaccine against avian encephalomyelitis virus. *Arch Virol*. 2018; 163: 2395-404.
- 14- De la Torre D, Nuñez L, Parra S, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP. Detection by Rt-Per and molecular characterization of tremovirus A obtained from clinical cases of avian encephalomyelitis (AE) outbreaks in Brazil. *Rev Bras Cienc*. 2018; 20: 527-36.
- 15- Kim H-R, Kwon Y-K, Lee H-S. Characterization of Avian Encephalomyelitis Outbreaks Occurred in South Korea from 2006 to 2013. *J Poult Sci*. 2015; 52(2): 151-52.
- 16- Haryanto A, Ermawati R, Wati V, Irianingsih SH, Wijayanti N. Analysis of viral protein-2 encoding gene of avian encephalomyelitis virus from field specimens in Central Java region, Indonesia. *Vet World*. 2016; 9(1): 25-31.
- 17- Al-Hammadi MA, Al-Rasheed M. Occurrences of avian encephalomyelitis virus in naturally infected chicks in Saudi Arabia's Eastern Province. *Open Vet J*. 2024; 14(1): 335-40.
- 18- Aghakhan S, Abshar N, Fereidouni SRN, Marunesi C, Khodashenas M. Studies on avian viral infections in Iran. *Arch Razi Inst*. 1994.
- 19- Asasi K, Farzinpour A, Tafti AK. Clinico-

pathological studies on avian encephalomyelitis in Shiraz, Iran. *Turk J Vet Anim Sci.* 2008; 32(3): 229-31.

20- Ghalyanchilangeroudi A, Madani SA, Najafi H, Ziafati Kafi Z, Sadri N, Sarmadi S, *et al.* The full genome characterization of avian

encephalomyelitis virus, Iran: a vertical transmission case. *Virus Genes.* 2024: 1-9.

21- Smyth JA, McNeilly F, Reilly G, McKillop ER, Cassidy J. Avian encephalomyelitis following oral vaccination. *Avian Pathol.* 1994; 23(3): 435-45.



## Detection and Phylogenetic Analysis of Avian Encephalomyelitis Virus: Study of an Imported Clinical Case

Hossein Hosseini<sup>1</sup>, Zahra Ziafati Kafi<sup>2</sup>, Soroush Sarmadi<sup>2</sup>, Fahimeh Jamiri<sup>2</sup>, Alireza Bakhshi<sup>2</sup>, Nazanin Sarvian<sup>2</sup>, Omid Eghbali<sup>2</sup>, Arash Ghalyanchi Langeroudi<sup>2\*</sup>

1- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.  
2- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: September 22, 2024; Revise: January 06, 2025; Accept: January 07, 2025



10.22034/nfvm.2025.479736.1257

### Summary

Avian encephalomyelitis (AE) is an infectious disease caused by the avian encephalomyelitis virus (AEV). In present study, brain tissue samples were collected from a 12-day-old broiler flock (imported from Turkey) located on farms in Mazandaran Province, Iran. The flock exhibited neurological symptoms suggestive of avian encephalomyelitis, including ataxia, intermittent tremors, head and neck shaking, weakness in the legs, and paralysis. Molecular testing and VP2 gene sequence analysis were performed. According to the results the strain PCRLAB-UT -2023 showed the highest similarity (99.65%) to strain ZCHP2/0912 from Poland and strain USP-BR-463-4 from Brazil. Further analysis revealed a high similarity (99.29%) of the current isolate with some of previously submitted vaccine strains in GenBank. This study reports the first case of AEV introduction into the country through importing an infected flock highlighting the importance of regular epidemiological investigations and continuous monitoring of imported birds. Furthermore, the genetic similarity between the isolate in this study and some registered vaccine strains in GenBank necessitate more precise monitoring of vaccination efficacy and post-vaccination surveillance. The findings can contribute to a better understanding of the potential mechanisms of live vaccine virus transmission and its impact on poultry flocks health, emphasizing the need to strengthen the monitoring of the origin of imported flocks.

**Keywords:** *Avian encephalomyelitis, Poultry, Vaccine, Phylogeny*