

# Diagnostyka wtęretowego zapalenia wątroby u kurcząt brojlerów, ze szczególnym uwzględnieniem metod biologii molekularnej

Paulina Szczubetek, Piotr Szeleszczuk

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Wtęretowe zapalenie wątroby (inclusion body hepatitis – IBH) jest adenowirusową chorobą stanowiącą poważny problem w chowie kurcząt rzeźnych na świecie. Choroba ta jest od wielu lat przyczyną poważnych strat ekonomicznych również w Polsce (1, 2, 3, 4).

W ostatnich latach w diagnostyce zakażeń adenowirusowych u drobiu znacząco wzrasta rola badań z zastosowaniem technik biologii molekularnej. W odniesieniu do klasycznych metod diagnostycznych są one mniej czasochłonne oraz pracochłonne. Metody te cechuje wysoka czułość, a analiza materiału genetycznego wirusa może dostarczyć dodatkowych informacji, ważnych dla poznania epidemiologii tych zakażeń.

## Adenowirusy ptaków

Wirusy należące do rodziny Adenoviridae powszechnie występują u wielu gatunków zwierząt. Są one izolowane zarówno od ptaków, jak i ssaków, gadów, płazów oraz ryb.

## Klasyfikacja adenowirusów ptaków

Zgodnie z wprowadzonym przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) podziałem, zarazki

tej grupy izolowane od ptaków zaliczane są do rodzajów: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus* i *Siadenovirus* (5).

Do rodzaju *Aviadenovirus* należą pięć gatunków adenowirusów izolowanych od kur: A, B, C, D, E (fowl adenovirus A, B, C, D, E – FadV A-E). Wśród pięciu gatunków FadV wyróżniono 12 serotypów oznaczonych w zależności od systemu klasyfikacji jako serotypy FadV 1-12 lub FadV 1-8a i 8b-11. Ponadto do rodzaju *Aviadenovirus* należą: adenowirus gęsi (goose adenovirus A), adenowirus sokołów (falcon adenovirus A) oraz adenowirus indyków typu B (turkey adenovirus B). Adenowirus indyków typu A (turkey adenovirus A) zakwalifikowany został do rodzaju *Siadenovirus*, a w obrębie rodzaju *Atadenovirus* z występujących u ptaków gatunków wyróżniono adenowirus kaczek (duck adenovirus A; 5).

Klasyczny podział adenowirusów ptaków obejmuje trzy grupy. Wirusy wywołujące wtęretowe zapalenie wątroby zaliczane są do grupy pierwszej. Oprócz pięciu gatunków FadV do tej grupy adenowirusów zaliczono również: adenowirusy gęsi 1-3 (goose adenovirus 1-3 – GAV1-3), adenowirus kaczek 2 (duck adenovirus-2 – DAV-2), adenowirus indyków 1,2 (turkey adenovirus – TAV1, TAV2) oraz gołębi (pigeon adenovirus – PiAV). Grupa druga adenowirusów ptasich obejmuje: wirus krwotocznego zapalenia jelit indyków

## Diagnosics of inclusion body hepatitis in broilers with particular emphasis on molecular biology methods

Szczubetek P., Szeleszczuk P., Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

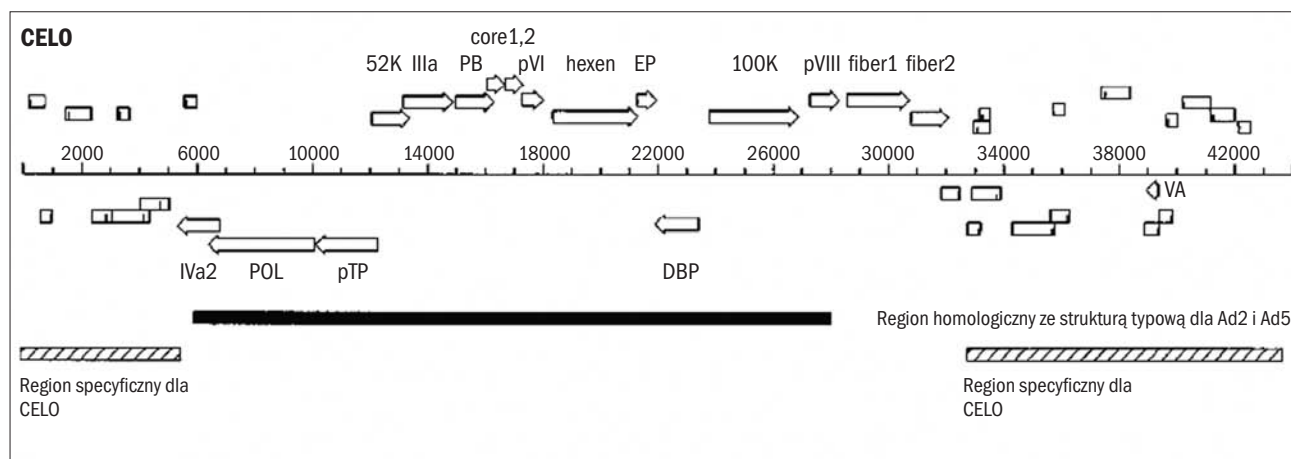
The aim of this paper was to present the novel diagnostic approach for inclusion body hepatitis (IBH), in young chickens. This adenoviral infection is characterized by sudden onset and sharply increasing mortality, short course, anemia and jaundice often accompanied by the presence of intranuclear inclusion bodies in hepatic cells. Demonstration of typical microscopic lesions in the liver, including intranuclear inclusions, is routinely used as a basis for diagnosis. Now, molecular diagnostic methods, namely polymerase chain reaction (PCR), and its modification such as real time PCR, enzyme restriction analysis and DNA sequencing can be used to detect and characterize the causative adenovirus. This paper provides basic information about methods of molecular diagnosis of IBH.

**Keywords:** avian adenovirus, inclusion body hepatitis, molecular biology methods.

(haemorrhagic enteritis virus – HEV), wirus choroby marmurkowej śledziony (marble spleen disease virus – MSDV) oraz ptasi adenowirus splenomegalii kurcząt (avian adenovirus of splenomegaly – AASV). Do trzeciej grupy adenowirusów ptasich należy wirus zespołu spadku nieśności 1976 (egg drop syndrome 1976 – EDS'76; 6).

## Budowa adenowirusów

Wielkość wirionu adenowirusów wynosi od 70 do 90 nm. Materiał genetyczny tych wirusów stanowi dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (double-stranded DNA – ds-DNA). Wielkość genomu adenowirusów wynosi 25–43,8 kbp. Materiał



Ryc. 1. Schemat organizacji genomu wirusa CELO (objaśnienia w tekście; 9)

genetyczny znajduje się w dwudziestościennym kapsydzie, bez otoczki, o symetrii ikoseadralnej. Kapsyd zbudowany jest z 252 kapsomerów: 240 niewierzchołkowych (heksony) i 12 wierzchołkowych (pentony; 7, 8, 9).

Wielkość genomu wirusa CELO (chicken embryo lethal orphan virus – CELO) wynosi około 43 804 bp, a stosunek G:C wynosi 54,3%. Genom tego zarazka jest znacznie większy niż genomy adenowirusów człowieka. Masa cząsteczkowa DNA wirusa CELO wynosi  $30 \times 106$ , w porównaniu z  $24 \times 106$  adenowirusa typu 2 (10). Lokalizację genów kodujących główne strukturalne białka wirusa (kapsomery niewierzchołkowe, kapsomery wierzchołkowe, wypustki (fiber), białka IIIa, PVI, pVII i pVIII) przedstawiono na **rycinie 1**. Porównanie z adenowirusami ssaków typu typów 2 (Ad2) i 5 (Ad5) wskazuje, że w genomie wirusa CELO brak jest genów kodujących białka wczesne E1, E3 i E4, jest natomiast fragment E2, który zawiera informację genetyczną o polimerazie DNA (POL), białku wiążącym DNA (DNA-binding protein – DBP) i białkach preterminalnych (pre-terminal protein – pTP; **ryc. 1**). Jak obrazuje to rycina fragmenty sekwencji o wielkości około 5 kb z lewej strony i 15 kb na prawym końcu genomu wirusa CELO wykazują brak homologii do genomu adenowirusów ssaków z rodzaju *Mastadenovirus* (9).

### Adenowirusowe choroby kurcząt

Najważniejsze jednostki chorobowe występujące u drobiu i wywoływane przez adenowirusy grupy pierwszej to wtętowe zapalenie wątroby (inclusion body hepatitis – IBH), zespół wodosierdza i zapalenie wątroby (hydropericardium-hepatitis syndrome – HHS), nadżerkowo-wrzodowe zapalenie błony śluzowej żołądka mięśniowego (gizzard erosion and ulceration – GEU). Ponadto adenowirusy tej grupy mogą być związane z zakażeniami układu oddechowego i zapaleniem pochewek ścięgienowych (11).

Brak jest szczegółowych danych epidemiologicznych dotyczących częstotliwości występowania tych jednostek chorobowych na terenie Polski. Jednak w ostatnich kilku latach znaczącym problemem w patologii drobiu w naszym kraju wydają się przypadki kliniczne IBH i GEU w stadach brojlerów kurzych. Natomiast do dziś na terenie Polski nie potwierdzono występowania HHS (1, 3, 12, 13,14,15,16).

### Etiologia wtętowego zapalenia wątroby

Czynnikiem etiologicznym wtętowego zapalenia wątroby są adenowirusy

należące do grupy I. Jednak etiologia jednostek chorobowych wywoływanych przez tę grupę adenowirusów nie jest w pełni poznana.

Z przypadków klinicznych wtętowego zapalenia wątroby u kurcząt brojlerów wyizolowano wszystkie serotypy, poza FadV-11. Według niektórych autorów szczególnie często izolowanym serotypem jest FadV-8 należący do gatunku E. W badaniach przeprowadzonych w Kanadzie serotyp ten był najczęściej izolowanym serotypem od kurcząt chorych na IBH (17). Pozostałe serotypy wyizolowane podczas tych badań to FadV-1, FadV-2 i FadV-4. Jednak badania przeprowadzone w innych rejonach geograficznych świata wykazały odmienny odsetek udziału poszczególnych serotypów adenowirusów kurzych w etiologii IBH. W Australii z 26 przypadków klinicznych wtętowego zapalenia wątroby wyizolowano serotypy: FadV-8b, FadV-11 oraz FadV-1. Wykazano również możliwość zakażenia ptaków różnymi serotypami FadV jednocześnie. W cytowanych badaniach wyizolowano z jednego klinicznego przypadku IBH serotypy FadV1 i FadV7 (12, 17, 18, 19, 20, 21). Między innymi badania przeprowadzone przez Snigha i wsp. (19) wykazały znaczący udział serotypu FadV-1 w etiologii IBH na terenie północnych Indii (pozostałe izolaty to FadV-6, FadV-7 i FadV-8).

Istnieje niewiele danych charakteryzujących etiologię wtętowego zapalenia wątroby na terenie Polski. Podczas ubiegłorocznego I Kongresu Praktyki Weterynaryjnej Mathias Voss (22) za najczęściej izolowane w naszym kraju uznał FadV 1, 5, 8 i 9. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań. Coraz większe rozpowszechnienie badań diagnostycznych z wykorzystaniem technik biologii molekularnej może w najbliższym czasie przyczynić się do pozyskania bardziej szczegółowych danych dotyczących wirusów wywołujących IBH na terenie Polski.

Należy również podkreślić, iż adenowirusy charakteryzują się bardzo zróżnicowaną patogennością. Nie określono dokładnej korelacji pomiędzy określonymi serotypami a patogennością szczepów. Wiele szczepów FadV nie wywołuje żadnych objawów klinicznych choroby bądź też wywołują je jedynie w warunkach obniżenia sprawności układu immunologicznego gospodarza. Fakt ten może znacząco utrudniać interpretację wyników badań diagnostycznych (23).

### Diagnostyka

Do niedawna, oprócz badań klinicznych i anatomopatologicznych, podstawowe znaczenie w diagnostyce zakażeń

adenowirusowych u drobiu odgrywały badania serologiczne, wirusologiczne oraz histopatologiczne. Jednak w ostatnich latach istotnie wzrosły możliwości zastosowania technik biologii molekularnej w diagnostyce tych zakażeń u ptaków (6).

### Objawy kliniczne

Nie ma charakterystycznych objawów klinicznych wtętowego zapalenia wątroby. W stadzie obserwowany jest gwałtowny wzrost liczby padłych ptaków (1–2% dziennie). Chore ptaki wykazują objawy ogólne, tj. apatię, nastroszenie piór, przysiadanie na skokach, błądzenie lub zażółcenie przydatków głowowych oraz błon śluzowych. Najwyższą śmiertelność notuje się około 3–4 dnia trwania choroby. Upadki mogą sięgać 30%, a według niektórych autorów nawet 40% stada, zwykle jednak nie przekraczają 10% (1, 2, 3, 4, 12, 21, 24).

### Zmiany anatomopatologiczne

Podstawowe zmiany anatomopatologiczne stwierdzane są w obrębie wątroby. Narząd jest powiększony, błądnie i kruchy z licznymi wybroczynami widocznymi pod jego torebką (mozaikowatość). Wybroczyny i wylewy krwawe mogą występować również w obrębie mięśni szkieletowych, tkanki podskórnej oraz nerek, które często są powiększone i blade. Ponadto stwierdzana jest aplazja i zażółcenie szpiku kostnego, zanik grasicy oraz bursy Fabrycjusza. Zmiany w obrębie narządów limfatycznych powinny nasuwać również podejrzenie współistniejących i często występujących w przebiegu IBH zakażeń silnie immunosupresyjnymi wirusami, tj. wirus choroby Gumboro (infectious bursal diseases virus – IBDV) czy wirus zakaźnej niedokrwiistości kurcząt (chicken infectious anemia virus – CIAV). Istnieją również doniesienia wykazujące bezpośrednio, supresyjne oddziaływanie FadV na układ odpornościowy gospodarza (1, 25).

### Badanie histopatologiczne

Badanie histopatologiczne jest niezwykle pomocne w diagnostyce zakażeń adenowirusowych u drobiu. W przypadku wtętowego zapalenia wątroby, oprócz cech uogólnionego zapalenia wątroby, stwierdza się w hepatocytach obecność kwaso- lub zasadochłonnych wewnątrzjądrowych ciałek wtętowych (3).

### Izolacja wirusa

Izolację adenowirusów grupy pierwszej przeprowadza się z wykorzystaniem hodowli komórkowych lub zakażając zarodki kurze. W przypadku szczepów FadV izolowanych od kurcząt najczęściej

zastosowanie znajdują hodowle komórek nerki (chicken kidney – CK) lub wątroby zarodka kurzego (chicken embryo liver – CEL; 6).

### Badanie serologiczne

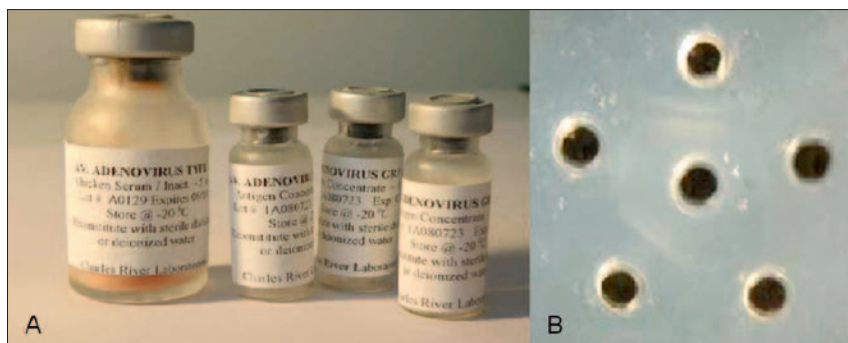
Podstawowe testy wykorzystywane w badaniu serologicznym FAdV to odczyn immunodiffuzji w żelu agarowym (AGID), odczyn seroneutralizacji (SN) oraz odczyn immunoenzymatyczny (ELISA). Obecnie dostępne są w Polsce komercyjne zestawy ELISA wykrywające przeciwciała skierowane przeciwko wszystkim 12 serotypom FAdV. Testy hemaglutynacji (HA) oraz zahamowania hemaglutynacji (HI) nie znajdują zastosowania w diagnostyce wtęretowego zapalenia wątroby ze względu na brak spontanicznej zdolności hemaglutynacji większości wirusów tej grupy (6).

### Zastosowanie technik biologii molekularnej

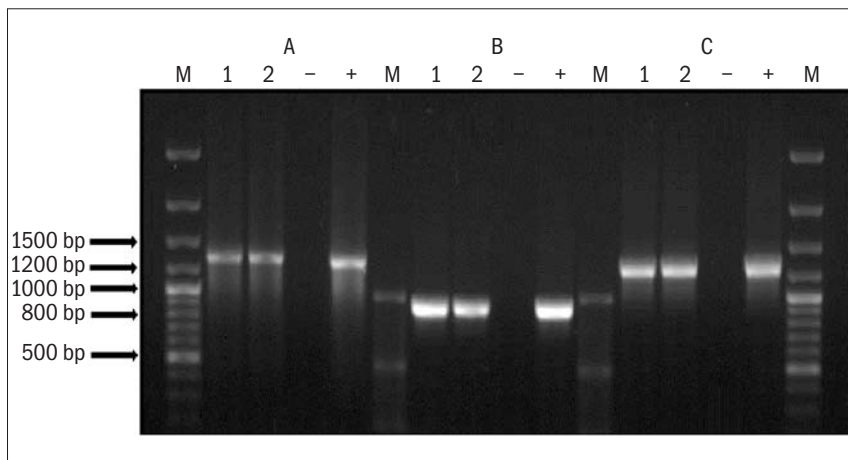
Metody oparte na wykrywaniu i analizie materiału genetycznego wirusa są obecnie powszechnie stosowane w diagnostyce zakażeń adenowirusowych u drobiu. Wśród tych technik podstawową metodą jest łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR). Coraz bardziej powszechne w diagnostyce wtęretowego zapalenia wątroby staje się także zastosowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Bardziej szczegółowych danych dostarczyć mogą takie metody, jak: analiza restrykcyjna DNA wirusa lub produktu amplifikacji PCR, analiza krzywej temperatur topnienia produktów (HRM) czy sekwencjonowanie materiału genetycznego. Podejmowano również próby zastosowania hybrydyzacji *in situ* (in situ hybridization – ISH) kwasów nukleinowych w diagnostyce zakażeń adenowirusowych u ptaków (6, 11, 19, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 31).

### PCR

Obecnie istnieje wiele opisanych reakcji PCR umożliwiających wykrywanie materiału genetycznego adenowirusów w tkankach i materiale biologicznym pochodzącym od ptaków. PCR znajduje zastosowanie jako osobna technika służąca wykryciu materiału genetycznego wirusa lub w połączeniu z innymi badaniami. Analiza restrykcyjna produktu amplifikacji lub jego sekwencjonowanie dostarcza dodatkowych informacji. Istnieje również możliwość zastosowania reakcji PCR typu multiplex. Opisano możliwość amplifikacji podczas jednej reakcji PCR matrycy DNA adenowirusów oraz patogenów,



Ryc. 2. Test precipitacji w żelu agarowym: antygen i surowice kontrolne (Charles River) – A, linie precipitacyjne w żelu agarowym, wynik pozytywny – B



Ryc. 3. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji reakcji PCR z użyciem starterów: A - H3/H4 (1319 bp), B - Hexon A/Hexon B (897 bp), C - H1/H2 (1219 bp); 1, 2 - badane próbki, - kontrola ujemna, + szczep Celophelps (Charles River), M - marker wielkości DNA

tj. IBDV, CIAV, oraz reowirusy (19, 20, 30, 31, 32, 33, 34).

### Analiza restrykcyjna

Możliwości zastosowania endonukleaz restrykcyjnych w celu klasyfikacji adenowirusów opisano już w 1984 r. Zastosowanie analizy restrykcyjnej wirusowego DNA (restriction endonuclease analysis-REA) z wykorzystaniem dwóch enzymów (BamHI, HindIII) umożliwiło przyporządkowanie wszystkich 12 referencyjnych serotypów FAdV do pięciu gatunków. Późniejsze badania wykazały możliwość wykorzystania analizy restrykcyjnej produktów amplifikacji reakcji PCR do zakwalifikowania poszczególnych szczepów FAdV nie tylko do jednego z pięciu gatunków, ale także do określonego serotypu. Takie zastosowanie tej metody w sposób znaczący ogranicza czas- i pracochłonność metod klasycznych. Zastosowanie tej metody pozwala również różnicować szczepy FAdV od wirusa zespołu spadku nieśności (6, 19, 20, 30, 35, 36).

### Seqwencjonowanie materiału genetycznego

Techniką, która umożliwiała najbardziej szczegółowe poznanie budowy

molekularnej wirusa jest sekwencjonowanie jego materiału genetycznego. Określenie sekwencji nukleotydowej produktów PCR określonych genów wirusów FAdV pozwala na analizę filogenetyczną szczepów występujących na danym terenie (23, 29).

### Real-time PCR

W ostatnich latach opracowano także możliwość zastosowania techniki PCR z analizą produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Wykorzystanie tej metody umożliwia szybką i bardzo precyzyjną diagnostykę. Badając materiał DNA wyizolowany z tkanek kurcząt eksperymentalnie zakażonych FdV-9, wykazano znacząco wyższą czułość tej metody w odniesieniu do klasycznej metody PCR, a także jej odmiany – nested PCR. W praktyce oznacza to możliwość uzyskania pozytywnego wyniku, nawet w przypadku obecności niewielkiej liczby cząstek wirusa w badanym materiale. Metoda ta pozwala również w razie potrzeby nie tylko na uzyskanie wyniku stwierdzającego obecność materiału genetycznego wirusa, ale również pozwala na oszacowanie liczby kopii amplifikatu i uzyskanie wyniku o charakterze półilościowym lub ilościowym.

Ponadto, podejmowane są próby charakterystyki izolatów na podstawie analizy krzywej topnienia (high resolution melting curve – HRM) produktów amplifikacji real-time PCR. Opracowane zostały wzorce krzywych temperatur topnienia produktów reakcji PCR umożliwiające zróżnicowanie 12 serotypów FAdV. W 2011 r. zespół australijskich badaczy potwierdził możliwość zastosowania tej metody genotypując 26 izolatów pochodzących z klinicznych przypadków IBH (21). Podobnie jak analiza restrykcyjna czy sekwencjonowanie, zastosowanie metody HRM może stać się bardzo użyteczną alternatywą diagnostyczną dla metod klasycznych (11, 21, 23, 27, 31).

## Podsumowanie

Metody biologii molekularnej pozwalają na szybszą i mniej pracochłonną diagnostykę laboratoryjną przypadków IBH. Charakteryzują się one wysoką czułością i swoistością. Umożliwiają nie tylko wykazanie obecności DNA wirusa, ale także umożliwiają jego dalszą charakterystykę. Jest to niezwykle istotne dla poznania epidemiologii zakażeń adenowirusowych, a także dla opracowania metod ich zwalczania i zapobiegania, zwłaszcza immunoprofilaktyki swoistej tych zakażeń. Należy jednak podkreślić, iż samo wykazanie obecności kwasu nukleinowego adenowirusa w badanym materiale nie może być podstawą diagnostyki wtęrotowego zapalenia wątroby w stadzie. Zagadnienia dotyczące patogenności adenowirusów nie są obecnie w pełni poznane i niektóre szczepy mogą nie wywoływać objawów klinicznych choroby bądź też wywoływać ją jedynie w warunkach immunosupresji. Dlatego też interpretacja wyników badań molekularnych przez lekarza weterynarii powinna zawsze być połączona z analizą obrazu klinicznego stada, wynikami badań anatomopatologicznych oraz innymi badaniami dodatkowymi.

## Piśmiennictwo

- Karpińska E., Samorek-Salomonowicz E.: Pierwszy przypadek wtęrotowego zapalenia wątroby kurcząt (IBH) w kraju. *Medycyna Wet.* 1981, **37**, 713-714.
- Kluciński W., Szeleszczuk P., Borzemska W., Malicka E.: Hematologic and biochemical changes in the blood of chicken in the course of natural infection with the virus inclusion body hepatitis. *Ann. Wars. Agricult. Univ. SGGW-AR Vet. Med.* 1986, **13**, 63-68.
- Szeleszczuk P., Malicka E., Żbikowski A.: Wtęrotowe zapalenie wątroby (Inclusion Body Hepatitis - IBH) u kurcząt znów groźne. *Magazyn Wet.* 2004, **13**, 48-51.
- Żbikowski A., Szeleszczuk P., Dolka B., Kosowska G., Karpińska E.: Zakażenia adenowirusowe kurcząt brojlerów w świetle danych piśmiennictwa i własnych obserwacji. *Mat. XXI Międzynarodowego Symposium Drobniarstwa PO WPSA, Wrocław – Szklarska Poręba*, 2009, s. 57.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.: *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, 2011.
- Hess M.: Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathol.* 2000, **29**, 195-206.
- Horne R.W., Bonner S., Waterson A.P., Wildy P.: The icosahedral form of an adenovirus. *J. Mol. Biol.* 1959, **1**, 84-86.
- Valentine R.C., Pereira H.G.: Antigens and structure of the adenovirus. *J. Mol. Biol.* 1965, **13**, 13-20.
- Chiocca S., Kurzbauer R., Schaffner G., Baker A., Mautner V., Cotton M.: The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *J. Virol.* 1996, **70**, 2939-2949.
- Green M., Pina M., Kimes R., Wensink P.C., MacHattie L.A., Thomas C.A.: Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1967, **57**, 1302-1309.
- Romanova N., Corredor J.C., Nagy E.: Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *J. Virol. Methods* 2009, **159**, 58-63.
- Koncicki A., Krasnodębska-Depta A., Mazur-Gonkowska B.: Nowe dane nt. roli adenowirusów w patologii drobiu. *Medycyna Wet.* 2006, **62**, 739-743.
- Mamczur J., Szeptycki J., Hess M., Houszka M., Szeleszczuk P., Bartoszkiewicz J.: Pierwsze rozpoznane w kraju przypadki adenowirusowej choroby kurcząt. *Polskie Drob.* 2008, **10**, 37-39.
- Tomczyk G., Domańska-Blicharz K., Minta Z., Kozdrui W., Śmietanka K., Bartczak R., Kozaczyński W.: Rozpoznanie pierwszych przypadków owrzodzenia żołądka mięśniowego u kurcząt brojlerów w Polsce. *Mat. XII Kongresu PTNW „Od nauki do praktyki” Olsztyn*, 2008, str. 64-65.
- Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Śmietanka K., Kozaczyński W., Minta Z.: Molecular characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens with gizzard erosions. *Poultry Sci.* 2011, **90**, 983-989.
- Szeleszczuk P.: Choroba Angara kur. *Weterynaria po Dyplomie*. Wyd. specjalne, 2002, 21-25.
- Ojkic D., Martin E., Swinton J., Vaillancourt J.P., Boulianne M., Gomis S.: Genotyping of Canadian isolates of fowl adenoviruses. *Avian Pathol.* 2008, **37**, 95-100.
- Ojkic D., Krell P.J., Tuboly T., Nagy E.: Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada. *Can J Vet Res.* 2008, **72**, 236-241.
- Singh A., Oberoi M.S., Grewal G.S., Hafez H.M., Hess M.: The use of PCR combined with restriction enzyme analysis to characterize fowl adenovirus field isolates from northern India. *Vet. Res. Commun.* 2002, **26**, 577-585.
- Meulemans G., Boschmans M., van der Berg T.P., Decaesstecker M.: Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathol.* 2001, **30**, 655-600.
- Steer P.A., O'Rourke D., Ghorashi S.A., Noormohammadi A.H.: Application of high-resolution melting curve analysis for typing of fowl adenoviruses in field cases of inclusion body hepatitis. *Aust. Vet. J.* 2011, **89**, 184-192.
- Voss M.: Diagnosis and control of avian adenovirus infections. *Materiały I Kongresu Praktyki Weterynaryjnej, VetForum, Łódź*, 2011, s.140.
- Marek A., Günes A., Schulz E., Hess M.: Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region. *J. Virol. Methods* 2010, **170**, 147-154.
- Niczyporuk J. S., Samorek-Salomonowicz E., Czekaj H.: Adenowirusy ptasie. *Zycie Wet.* 2010, **85**, 821-825.
- Singh A., Grewal G.S., Maiti N.K., Oberoi M.S.: Effect of fowl adenovirus-1 (IBH isolate) on humoral and cellular immune competency of broiler chicks. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2006, **29**, 315-321.
- Goodwin M.A., Latimer K.S., Resurreccion R.S., Miller P.G., Campagnoli R.P.: DNA in situ hybridization for the rapid diagnosis of massive necrotizing avian adenovirus hepatitis and pancreatitis in chicks. *Avian Dis.* 1996, **40**, 828-831.
- Günes A., Marek A., Graf B., Berger E., Hess M.: Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *J. Virol. Methods* 2012, **183**, 147-153.
- Latimer K.S., Niagro F.D., Williams O.C., Ramis A., Goodwin M.A., Ritchie B.W., Campagnoli R.P.: Diagnosis of avian adenovirus infections using DNA in situ hybridization. *Avian Dis.* 1997, **41**, 773-782.
- Meulemans G., Couvreur B., Decaesstecker M., Boschmans M., van den Berg T.P.: Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. *Avian Pathol.* 2004, **33**, 164-170.
- Raue R., Hess M.: Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *J. Virol. Methods* 1998, **73**, 211-217.
- Steer P.A., Kirkpatrick N.C., O'Rourke D., Noormohammadi A.H.: Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region. *J. Clin. Microbiol.* 2009, **47**, 311-321.
- Caterina K.M., Frasca S. Jr, Girshick T., Khan M.L.: Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. *Mol. Cell Probes* 2004, **18**, 293-298.
- Jiang P., Ojkic D., Tuboly T., Huber P., Nagy E.: Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses. *Can. J. Vet. Res.* 1999, **63**, 124-128.
- Xie Z., Fadl A.A., Girshick T., Khan M.L.: Detection of avian adenovirus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 1999, **43**, 98-105.
- Pallister J.A., Sheppard M.: Comparison by restriction enzyme analysis of three fowl adenoviruses of varying pathogenicity. *Vet. Microbiol.* 1996, **48**, 155-163.
- Zsák L., Kisary J.: Grouping of fowl adenoviruses based upon the restriction patterns of DNA generated by BamHI and HindIII. *Intervirology* 1984, **22**, 110-114.

Lek. wet. Paulina Szczubelek, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa