مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۲، ۲۰۷-۱۹۹
DOI: 10.22059/jvr.2018.136114.2380
Original Article
Archive of SID

بررسی جراحات هیستوپاتولوژیک ناشی از آلودگی تجربی همزمان ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال

آیدین عزیزپور[1*] حسین گودرزی[2] سعید چرخکار[3] رضا ممیز[2] محمد حسن حبل الورید[4] پیمان بیژن زاد[5]

۱) دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲) بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۳) گروه بیماریهای طیور، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران
۴) بخش پاتولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۵) گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

(دریافت مقاله: ۱۵ بهمن ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۲ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: علی‌رغم اینکه ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) به تنهایی قادر به ایجاد جراحات هیستوپاتولوژیک در پرندگان عفونی هستند. اما تا به حال، مطالعه‌ای در خصوص جراحات بافتی ناشی از این عوامل بیماریزا به صورت همزمان در جوجه‌های عاری از عوامل بیماریزای خاص (SPF) انجام نشده است. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی نوع، شدت و میزان جراحات بافتی عفونت همزمان ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپH9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در جوجه‌های SPF می‌باشد. **روش کار:** تعداد ۶۰ قطعه جوجه SPF نژاد لگهورن یک روزه به صورت تصادفی در سه گروه بیست تایی تقسیم شدند. سپس در سن ۲۱ روزگی، جوجه‌های گروه اول فقط با ویروس آنفلوانزا و جوجه‌های گروه دوم با ویروس آنفلوانزا و باکتری ORT به طور همزمان تلقیح شدند و گروه سوم بعنوان کنترل PBS دریافت کردند. در روزهای ۲ تا ۱۶ پس از تلقیح، سه پرنده از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. نمونه‌های بافتی از نای، ریه، کبد، کلیه، بورس فابریسیوس، تیموس، طحال و لوزه‌های سکومی جهت مطالعه هیستوپاتولوژی اخذ گردید و پس از آماده سازی و تهیه مقاطع بافتی به ضخامت‌های ۶-۵ میکرونی با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. **نتایج:** شدت جراحات هیستوپاتولوژی در جوجه‌های گروه دوم نسبت به گروه اول بیشتر بود. هیچ گونه تغییرات بافتی در گروه کنترل مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه نشـان داد در جوجه‌های عفونی شـده به طور همزمان با تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا و باکتری ORT، جراحات هیستوپاتولوژی ناشی از ویروس آنفلوانزا تشدید می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: ویروس آنفلوانزای پرندگان، ORT، جراحات هیستوپاتولوژی، جوجه‌هایSPF

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یک بیماری ویروسی نسبتاً حاد دستگاه تنفسی و شدیداً مسری با انتشار جهانی می‌باشد (۲۱). ویروس‌های آنفلوانزا متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده می‌باشند که تنها تیپ A آن‌ها در پرندگان باعث بیماری می‌شوند (۲۱، ۱). پس از اپیدمی آنفلوانزای پرندگان در ایران، ویروس جدا شده تحت تیپ H9N2 تشخیص و نامگذاری گردید که از نظر حدت شدیداً بیماریزا نمی‌باشد (۲۶). اما در طی دهه‌های اخیر، گزارش‌های زیادی مبنی بر درگیری گله‌های صنعتی کشـورهای خاورمیانه به ویژه ایران با ویروس آنفلوانـزای A تحت تیپ H9N2 وجود دارد کـه این ویروس بطور مداوم مشکلات جدی و خسارات نسبتاً سنگینی به پیکر صنعت طیور وارد کرده است (۲۳، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۲، ۱). در حالیکه این ویروس به تنهایی فقط قادر به ایجاد بیماری خفیف می‌باشد (۲۶، ۱۳، ۶).

براسـاس گزارش‌های علمی، در صورت ظهور شـرایط مستعد کننده نظیر ابتلا به عفونت‌های همزمان ویروسی و باکتریایی، بیماریزایی ویروس H9N2 آنفلوانزا تشدید می‌یابد (۱۹، ۱۸، ۱۳، ۸، ۴، ۲). به‌طوری‌که در طی سـال ۱۳۷۹در کمپلکس‌های تنفسی با تلفات زیاد، عفونت همزمان تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) در کشور تأیید شده است (۴).

علی‌رغم اینکه ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 و باکتری ORT به تنهایی قادر به ایجاد جراحات هیسـتوپاتولوژیک مشـخص در پرندگان عفونی هسـتند و در مورد جراحات پاتولوژی هر کدام از این عوامل بیمایزا مطالعات زیادی انجام شـده اسـت (۲۵، ۲۴، ۱۴، ۱۱، ۱۰، ۹، ۳). اما تا به حال مطالعه‌ای بر روی ضایعات هیستوپاتولوژیکی ناشی از عفونت همزمان ویـروس H9N2 آنفلوانزا و باکتـری ORT در جوجه‌های عاری از عوامل بیماریزای خاص (SPF) صورت نگرفته اسـت تـا جراحات بافتی مرتبط با این عفونت دقیقا مشـخص گردد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی نوع جراحات بافتی عفونت همزمان تحت تیـپ H9N2 ویروس آنفلوانزا و باکتری ORT در جوجه‌های SPF و مشـخص نمودن میزان و شدت این جراحات می‌باشد.

مواد و روش کار

در ایـن بررسـی جدایه ایرانی ویـروس آنفلوانزای طیـور تحت تیپ

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۵-۳۲۵۴۵۶۲۱ نمابر: ۰۴۵-۳۲۵۴۵۶۲۳ Email: aidin_azizpour@uma.ac.ir
www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱. مقایسه جراحات هیستوپاتولوژی بافت‌های نای، ریه، کلیه و کبد در سه گروه مورد مطالعه. گروه اول: آنفلوانزا؛ گروه دوم: همزمان آنفلوانزا و ORT؛ گروه سوم: کنترل. a,b,c: نشانگر اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

اندام	گروه	روزهای پس از تلقیح						
		۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶
نای	اول	۲/۲۰±۰/۲۵ b	۳/۰۰±۰/۲۴ b	۲/۸۰±۰/۳۱ b	۲/۰۰±۰/۴۸ b	۱/۴۰±۰/۳۶ a	۱/۲۰±۰/۲۲ a	۱/۰۰±۰/۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a
	دوم	۲/۶۰±۰/۲۵ b	۳/۲۰±۰/۲۰ c	۳/۶۰±۰/۴۶ c	۲/۶۰±۰/۲۴ c	۲/۰۰±۰/۳۱ b	۱/۴۰±۰/۲۵ a	۱/۲۰±۰/۳۲ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a
ریه	اول	۱/۶۰±۰/۲۵ a	۲/۶۰±۰/۵۶ b	۳/۰۰±۰/۳۱ b	۲/۸۰±۰/۲۰ b	۱/۴۰±۰/۲۵ a	۱/۲۰±۰/۲۴ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a
	دوم	۲/۰۰±۰/۱۴ b	۳/۰۰±۰/۶۸ c	۳/۴۰±۰/۴۲ c	۳/۶۰±۰/۱۲ c	۳/۸۰±۰/۲۰ b	۳/۶۰±۰/۲۸ b	۲/۶۰±۰/۴۰ b	۱/۸۰±۰/۳۷ a
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a
کلیه	اول	۲/۴۰±۰/۲۵ b	۳/۴۰±۰/۲۴ b	۳/۴۰±۰/۵۴ b	۲/۸۰±۰/۳۸ b	۲/۲۰±۰/۲۰ b	۱/۶۰±۰/۱۸ a	۱/۲۰±۰/۲۴ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a
	دوم	۲/۲۰±۰/۲۴ b	۲/۸۰±۰/۴۴ b	۳/۴۰±۰/۶۲ c	۳/۸۰±۰/۵۴ c	۳/۴۰±۰/۴۷ c	۳/۰۰±۰/۲۴ b	۲/۲۰±۰/۵۲ b	۱/۶۰±۰/۲۰ a
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a
کبد	اول	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۴۰±۰/۵۴ b	۱/۶۰±۰/۳۷ b	۲/۲۰±۰/۳۷ b	۱/۶۰±۰/۳۷ b	۱/۲۰±۰/۲۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a
	دوم	۱/۶۰±۰/۳۱ b	۱/۸۰±۰/۶۵ b	۲/۸۰±۰/۲۴ c	۲/۶۰±۰/۳۷ c	۲/۲۰±۰/۴۹ b	۱/۶۰±۰/۱۳ a	۱/۴۰±/۳۸ a	۱/۲۰±/۱۰ a
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a	۱/۰۰±۰/۰۰ a

(H۹N۲) A/chicken/Iran/m/۱۳۸۷/۷-ORT-R۸۷ (JF۸۱۰۴۹۱) جدا شده از گله‌های طیور تجاری کشور که بیماریزایی آن با استفاده از روش‌های مولکولی تأیید شده بود (۵)، از بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج به جوجه‌هایSPF نژاد لگهورن گروه آزمایش تلقیح گردیدند. ابتدا شصت قطعه جوجه از شرکت ونکی کشور هند (Venkey's, India) تهیه و در سن یک روزگی به صورت تصادفی به سه گروه ۲۰ تایی تقسیم و به صورت جداگانه در داخل ایزولاتورهای فشار مثبت (ساخت کشور اسکاتلند Bell Isolation System) در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه سرم‌سازی رازی کرج در شرایط کنترل شده نگهداری شدند. سپس در سن ۲۱ روزگی، تمامی جوجه‌های گروه اول فقط با ویروس H۹N۲ با دز ۱×۱۰^{۶} $EID_{۵۰}$ به روش قطره چشمی تلقیح شدند و پرندگان گروه دوم بطور همزمان با ویروس H۹N۲ و باکتری ORT به ترتیب با دزهای ۱×۱۰^{۶} $EID_{۵۰}$ و ۱×۱۰^{۱۰} CFU به روش‌های قطره چشمی و داخل نایی آلوده شدند. گروه سوم بعنوان کنترل صرفاً PBS به روش قطره چشمی دریافت کردند. پس از تلقیح عوامل بیماریزا تمامی جوجه‌ها از نظر علائم بالینی و تلفات به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و علائم کالبدگشایی نیز ثبت گردید. در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ پس از تلقیح، تعداد سه جوجه از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و به روش انسانی کشته و کالبدگشایی شدند (۲). سپس از بافت‌هایی نظیر نای، ریه، کبد، کلیه، بورس فابریسیوس، تیموس، طحال و لوزه‌های سکومی نمونه‌برداری به عمل آمد.

جهت مطالعات هیستوپاتولوژی، نمونه‌های اخذ شده به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول فرمالین بافر ۱۰٪ فیکس گردیدند و پس از طی مراحل پاساژ بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی با ضخامت‌های µm ۶-۵ برش داده شدند. مقاطع پس از پارافین‌زدایی و رنگ‌آمیزی با روش هماتوکسیلین و ائوزین در بخش پاتولوژی موسسه سرم‌سازی رازی کرج مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰، ۱۱). پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی از گروه‌های آزمایش و کنترل، این مقاطع از لحاظ آسیب‌های پاتولوژیک بررسی شدند. به این منظور، انواع ضایعات مشاهده شده براساس شدت جراحات از ۱+ تا ۴+ (۱+: بافت طبیعی، ۲+: آسیب جزئی، ۳+: آسیب متوسط، ۴+: آسیب شدید) طبق روش Bijanzad و همکاران در سال۲۰۱۳ درجه‌بندی گردید (۷) و نهایتاً از جراحات بافت‌های مورد مطالعه عکس برداری صورت گرفت.

آنالیز آماری: داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار ver. ۱۸ SPSS. مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای مقایسه جراحات بافتی گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آماری غیرپارامتری کروسکال والیس (Kruskal Wallis) استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

علائم بالینی و کالبدگشایی گروه‌های مورد مطالعه: تعداد اندکی از جوجه‌های گروه اول (۲۰٪) صرفا کزکردگی و ژولیدگی پرها داشتند و در کالبدگشایی نیز فقط پنومونی در ریه مشاهده گردید. در حالیکه تعداد ۶ قطعه (۳۰٪) از جوجه‌های گروه دوم از روز دوم دچار کزکردگی، ژولیدگی پرها، کم اشتهایی و مشکل تنفسی شدند. بطوریکه اکثر جوجه‌ها بیشترین علایم بالینی را در روز سوم نشان دادند که در طول آزمایش ۳ عدد تلفات مشاهده گردید و در کالبدگشایی پرخونی نای، تورم کیسه‌های هوایی (تصویر ۱)، پنومونی، تورم کلیه‌ها و کبد وجود داشت. اما جوجه‌های گروه کنترل در طول مطالعه هیچ گونه علایم بالینی و کالبدگشایی و تلفاتی نداشتند.

یافته‌های هیستوپاتولوژی: جراحات بافتی اندام‌های مورد مطالعه در

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲. مقایسه جراحات هیستوپاتولوژی بافت‌های بورس، طحال، تیموس و لوزه سکومی در سه گروه مورد مطالعه. گروه اول: آنفلوانزا؛ گروه دوم: همزمان آنفلوانزا و ORT؛ گروه سوم: کنترل. ,b,c a: نشانگر اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

اندام	گروه	روزهای پس از تلقیح							
		۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶
بورس‌فابریسیوس	اول	۱/۴±۰/۲۵ a	۲/۰±۰/۳۰ b	۲/۲±۰/۴۰ b	۲/۶±۰/۴۸ b	۲/۸±۰/۳۶ b	۲/۴±۰/۴۲ b	۱/۸±۰/۲۸ a	۱/۲±۰/۲۰ a
	دوم	۲/۰±۰/۲۰ b	۲/۸±۰/۲۴ bc	۳/۰±۰/۲۰ c	۳/۲±۰/۶۵ c	۳/۶±۰/۳۱ c	۳/۸±۰/۲۰ c	۲/۶±۰/۲۰ b	۱/۸±۰/۱۲ b
	سوم	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a
طحال	اول	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۲±۰/۴۲ a	۱/۴±۰/۲۶ a	۱/۸±۰/۳۰ b	۱/۸±۰/۱۲ b	۱/۴±۰/۳۲ a	۱/۲±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a
	دوم	۱/۶±۰/۲۴ a	۲/۲±۰/۳۸ b	۲/۸±۰/۱۴ b	۳/۰±۰/۵۶ c	۳/۴±۰/۴۲ c	۳/۸±۰/۸۴ b	۲/۸±۰/۱۲ b	۱/۸±۰/۲۰ b
	سوم	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a
تیموس	اول	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۴±۰/۲۴ a	۱/۶±۰/۴۰ b	۲/۲±۰/۳۸ b	۱/۸±۰/۲۰ b	۱/۶±۰/۱۸ a	۱/۲±۰/۲۴ a	۱/۰±۰/۰۰ a
	دوم	۱/۶±۰/۳۲ a	۲/۴±۰/۴۷ b	۲/۸±۰/۲۴ c	۳/۰±۰/۴۰ c	۳/۴±۰/۳۷ c	۳/۰±۰/۴۰ b	۲/۴±۰/۲۰ b	۱/۶± ۰/۲۰ b
	سوم	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a
لوزه‌های سکومی	اول	۱/۲±۰/۴۰ a	۱/۴±۰/۳۲ a	۱/۶±۰/۱۲ a	۲/۲±۰/۵۴ b	۲/۰±۰/۳۷ b	۱/۶±۰/۲۰ a	۱/۴±۰/۱۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a
	دوم	۱/۲±۰/۵۲ a	۱/۶±۰/۶۵ a	۲/۲±۰/۴۰ b	۲/۶±۰/۴۷ b	۳/۲±۰/c۲۰	۳/۴±۰/۵۲ b	۲/۴±۰/۴۲ b	۱/۶±۰/۲۴ b
	سوم	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a	۱/۰±۰/۰۰ a

گروه‌های آزمایشی به شـرح ذیل می‌باشد. هیچ گونه تغییرات پاتولوژیک در بافت‌هـای گـروه کنتـرل در طول مطالعه مشـاهده نگردیـد. تصاویر میکروسـکوپ نـوری تعدادی از بافت‌هـای گروه آزمایشـی اول و دوم در تصاویر ۲تا ۷ نشان داده شده است.

نـای: در گـروه اول در روزهای ۲ تا ۸ پـس از تلقیح پرخونی، ریزش مژک‌ها و انفصال سلول‌های بافت پوششی و از روز ۶بعد از تلقیح هیپرپلازی بافت پوششی مشاهده گردید (تصویر ۲) که از روز ۱۰ آزمایش نای طبیعی بنظر می‌رسـید. در گروه دوم از روزهای ۲، ۴ و ۶ بعد از تلقیح علائم تورم نای (Trachitis) با از دست دادن مژه‌ها، کنده شدن و نکروز مخاط همراه با ارتشـاح تک هسته‌ایها در زیر مخاط و همچنین هیپرپلازی مخاط دیده شد که از روز ۸ آزمایش نای ترمیم گردید و در روز ۱۲ به حداکثر میران خود رسید. در جوجه‌های تلف شده (بویژه جوجه تلف شده روز دوم) علائم تورم نای چرکی با پرخونی شدید، ادم زیر مخاطی و اکسودای چرکی در مجرا و ارتشاح هتروفیل‌ها در زیر مخاط همراه با هیپرپلازی لایه اپیتلیال مشاهده گردید (تصویر ۳). براساس مقایسه آماری بین دو گروه تیمار در روزهای ۴ تا ۱۰پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در نای اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت (p<۰/۰۵).

ریـه: در گروه اول پرخونـی و خونریزی کانونی در روزهای ۶-۲ بعد از تلقیح مشـاهده شد، بعلاوه در روزهای ۶-۴ ادم نیز وجود داشت. همچنین پنومونی کانونی همراه با ارتشـاح سلول‌های تک هسته‌ای و هتروفیل در روزهای ۸-۴ بعد از تلقیح دیده شد. در گروه دوم پرخونی، ادم اطراف عروقی همراه با نکروز و نشـت فیبرین و ارتشاح تک‌هسته‌ای‌ها و کمی هتروفیل (پنومونی) در روزهای ۲ تا ۱۰ بعد از تلقیح مشـاهده گردید (تصویر ۴)، که از روز ۱۲ بعد از تلقیح از شـدت ضایعات کاسته شد (سیر بهبودی طولانی می‌باشـد). در روزهـای ۲ تا ۱۴ پس از آزمایش بیـن دو گروه تیمار از نظر جراحات بافتی ریه اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

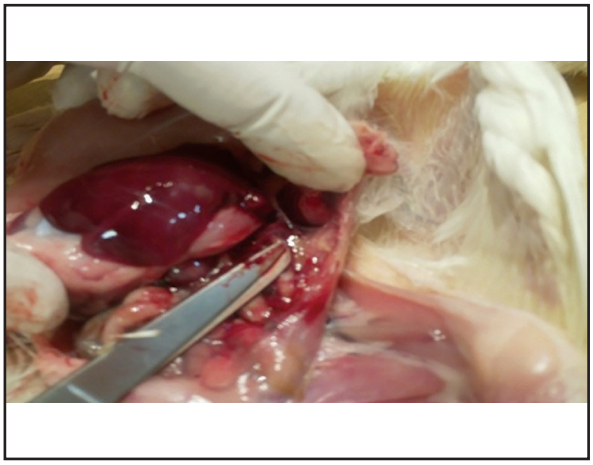
کلیـه: در گـروه اول پرخونی و خونریزی و نکـروز لوله‌های ادراری در روزهای ۲ تا ۱۰ بعد از تلقیح مشاهده گردید، که از روز ۸ به بعد نیز ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای‌ها دیده شد، بطوریکه ترمیم لوله‌های ادراری از ۱۰ روزگـی شـروع و در ۱۴ روزگی به حداکثر میزان خود رسـید. در گروه دوم پرخونـی و خونریزی و نکروز لوله‌هـای ادراری از روز ۲ تا ۱۲ بعد از تلقیح مشـاهده گردید و در روز دوم به شـکل نکروز شدید و گسترده و بتدریج از شدت آن کاسته شد، به‌طوری‌که در روز ۱۲ بشکل نکروز خفیف و کانونی دیده شـد (تصویر ۵). شـروع ترمیم لوله‌های اداری در گروه همزمان از ۱۲ روزگـی بود و در ۱۶روزگی طبیعی بنظر می‌رسـید. گروه‌های تیمار از نظر ضایعات بافتی کلیه در روزهای ۶ تا ۱۴ پس از آزمایش با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵).

کبد: در گروه اول از روز ۴ تا ۱۲ بعد از تلقیح، ضایعات به شکل پرخونی سینوروئیدها و سیاهرگ مرکزی و تعدادی کانون‌های ارتشاح تک هسته‌ای بـود. در گروه دوم عمده‌ترین ضایعه مشـاهده شـده از روز ۲ بعد از تلقیح، پرخونی در سینوروئیدها و سـیاهرگ مرکزی و در برخی موارد کانون‌های ارتشـاح تک هسـته‌ایها در پارانشـیم کبد و اطراف عروق بود (تصویر ۶). براسـاس مقایسـه آماری بین دو گروه تیمار در روزهـای ۲، ۶ و ۸ پس از آزمایش از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در کبد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p<۰/۰۵).

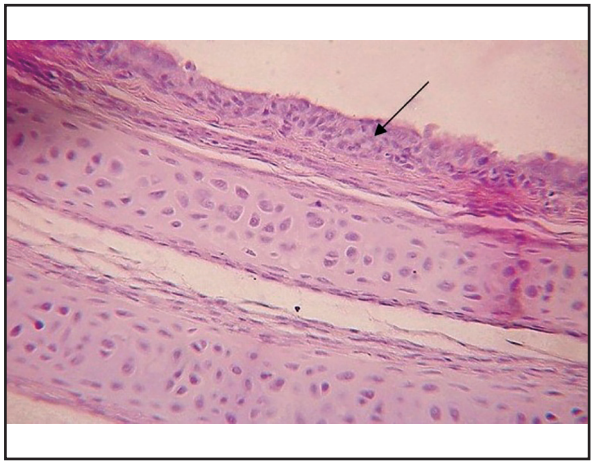
بورس فابریسیوس: در گروه اول تنها در روزهای ۲ تا ۱۲ بعد از تلقیح، تخلیه خفیف لنفوسـیت‌های فولیکول‌های لنفاوی دیده شد. در گروه دوم کمی تخلیه لنفوسیت‌های فولیکول‌های لنفاوی و در مواردی کمی آتروفی فولیکول‌ها از روزهای ۲ تا ۱۶ مشـاهده گردیـد (تصویر ۷). در جوجه‌های تلف شده علائم تخلیه لنفوسیت‌های فولیکول‌های لنفاوی همراه با نکروز

www.SID.ir

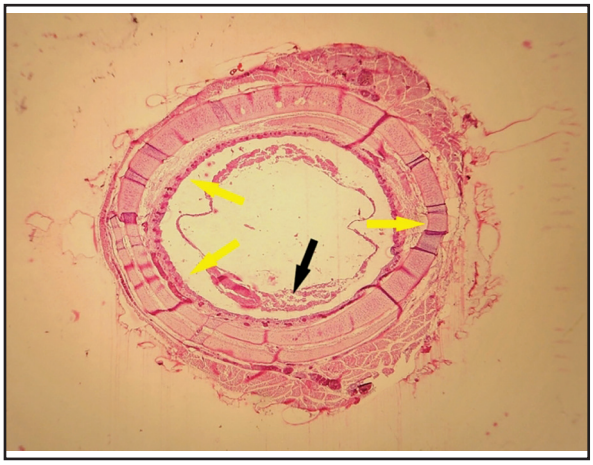
Archive of SID



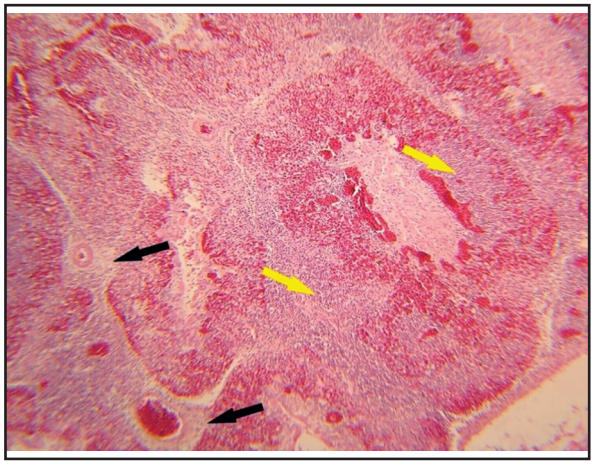
تصویر ۱. تورم و کدر شدن کیسه‌های هوایی در جوجه گروه همزمان آنفلوانزا و ORT در روز دوم پس از تلقیح.



تصویر ۲. نای جوجه گروه آنفلوانزا- در روز ششم پس از تلقیح از بین رفتن مژه‌ها و هیپرپلازی بافت پوششی (فلش) همراه با تشکیل بافت پوششی مطبق غیر متمایز قابل مشاهده است.



تصویر ۳. نای جوجه تلف شده گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز دوم پس از تلقیح تورم نای، پرخونی، ادم (فلش زرد رنگ) و اکسودای چرکی در مجرا (فلش سیاه رنگ) مشاهده می‌شود.



تصویر ۴. ریه جوجه تلف شده گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز سوم پس از تلقیح پنومونی، پرخونی، ادم اطراف عروقی همراه با نکروز و نشت فیبرین (فلش‌های سیاه رنگ) و ارتشاح لکوسیت‌ها (فلش‌های زرد رنگ) دیده می‌شود.

لنفوسیت‌ها و ارتشاح خفیف هتروفیل‌ها بود. گروه‌های تیمار از نظر جراحات بافتی بورس فابریسیوس در طول آزمایش بجز روز ۴ پس از تلقیح با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$).

طحال: در گروه اول از روز ۸ تا ۱۲ بعد از تلقیح، کمی افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی دیده شد. در گروه دوم از روز ۴ بعد از تلقیح، هیپرپلازی سلول‌های رتیکولوآندتلیال و از روز ۱۰ تا ۱۶ بعد از تلقیح افزایش فولیکول‌های لنفاوی مشاهده گردید. همچنین در جوجه‌های تلف شده روزهای ۲ و ۳ به ترتیب نکروز خفیف و شدید لنفوسیت‌ها همراه با ارتشاح هتروفیل وجود داشت. براساس مقایسه آماری بین دو گروه تیمار در روزهای ۴ تا ۱۶ پس از آزمایش از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در طحال اختلاف آماری معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$).

تیموس: در گروه اول در روزهای ۴ تا ۱۲ بعد از تلقیح، علائم پرخونی در بخش مرکزی ملاحظه گردید. در گروه دوم تنها کاهش خفیف لنفوسیت‌های بخش قشری مشاهده شد. در جوجه‌های تلف شده ضایعات تیموس بشکل پرخونی و نکروز لنفوسیت‌ها در بخش مرکزی همراه با ارتشاح خفیف هتروفیل‌ها بود. بین دو گروه تیمار در روزهای ۴ تا ۱۶ پس از تلقیح از نظر جراحات تیموس اختلاف معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$).

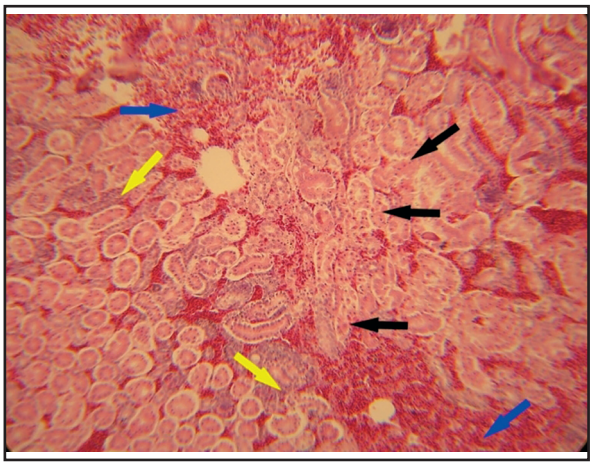
لوزه‌های سکومی: در گروه اول از روزهای ۸ تا ۱۲ بعد از تلقیح، افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی مشاهده گردید. در گروه دوم از روز ۶ بعد از تلقیح کمی افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی مشاهده گردید. دو گروه تیمار در روزهای ۶ و ۱۰ تا ۱۶ پس از آزمایش از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در لوزه‌های سکومی اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$).

بحث

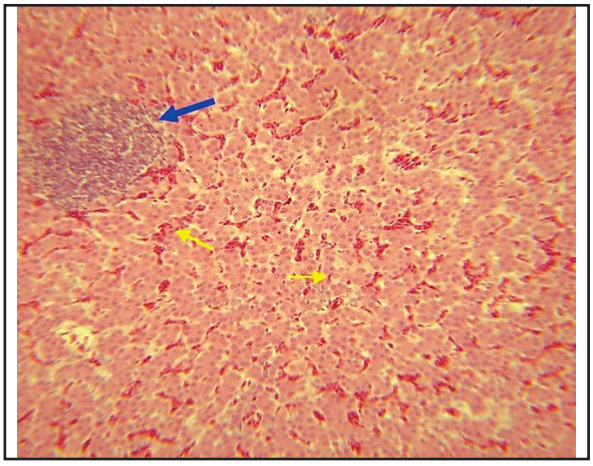
کمپلکس‌های تنفسی مهمترین بیماریهایی هستند (۱۸، ۴) که ماکیان به ویژه طیور صنعتی را درگیر می‌نمایند. این بیماریها به واسطه تلفات سنگین، هزینه درمانی زیاد و کاهش میزان تولید ضررهای اقتصادی فراوانی به صنعت طیور وارد می‌کنند (۲۴، ۴). عوامل مختلف ویروسی

www.SID.ir

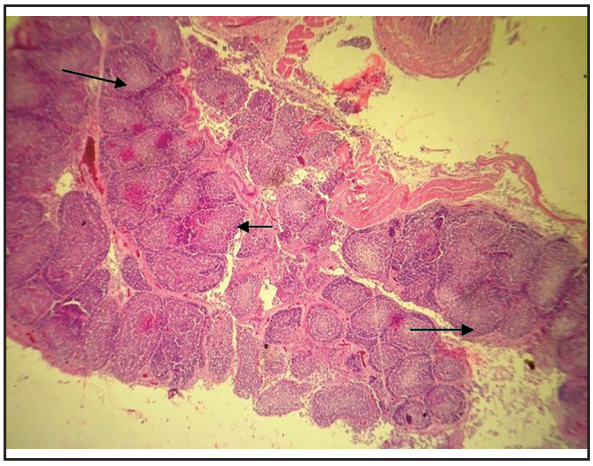
Archive of SID



تصویر ۵. کلیه جوجه تلف شده گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز سوم پس از تلقیح نفریت، پرخونی، خونریزی (فلش‌های آبی رنگ) و نکروز لوله‌های ادراری (فلش‌های سیاه رنگ) و ارتشاح کانونی لکوسیت‌ها (فلش‌های زرد رنگ) مشاهده می‌شود.



تصویر ۶. کبد جوجه تلف شده گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز دوم پس از تلقیح پرخونی در سینوزوئیدها (فلش‌های زرد رنگ) و یک کانون نسبتاً بزرگ ارتشاح تک هسته‌ای در پارانشیم کبد (فلش آبی رنگ) دیده می‌شود.



تصویر ۷. بورس فابریسیوس جوجه گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز شانزدهم پس از تلقیح تخلیه لنفوسیت‌های فولیکول-های لنفاوی (فلش‌های سیاه رنگ) مشاهده می‌شود.

و باکتریایی می‌توانند در ایجاد سندرم‌های تنفسی نقش داشته باشند که ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H۹N۲ و باکتری \ورنیتوباکتریوم رینوتراکئال از مهمترین عوامل بیمازیرا هستند که در طی دهه‌های اخیر در گله‌های مبتلا به اختلالات شدی تنفسی و تلفات زیاد در کشور گزارش شدند (۴). اگرچه روند بیماریزایی و جراحات بافتی ویروس H۹N۲ آنفلوانزا و باکتری ORTتوسط محققین مختلف بررسی گردیده است (۲۵، ۲۴، ۱۹، ۱۰، ۹، ۶، ۱). اما تا به حال هیچ گونه مطالعه‌ای در خصوص جراحات بافتی ناشی از این دو عامل بیماریزا به صورت عفونت همزمان در جوجه‌های SPF صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق جراحات هیستوپاتولوژی ناشی از ویروس H۹N۲آنفلوانزا و باکتری \ورنیتوباکتریوم رینوتراکئال به صورت آلودگی همزمان مورد بررسی قرار گرفت.

Mo و همکاران در سال ۱۹۹۷، با تلقیح داخل نایی سویه‌های ویروس آنفلوانزا با بیماریزایی کم (nHPAI) و زیاد (HPAI) به ماکیان، ضایعات ایجاد شده در اثر ویروس‌های nHPAI و آنتی‌ژن آن‌ها را در بافت‌های نای و ریه گزارش نمودند، همچنین این محققین نشان دادند که ویروس‌های HPAI موجب ایجاد جراحات نکروز و التهاب در بورس فابریسیوس، تیموس، طحال، قلب، پانکراس، کلیه، مغز، نای، ریه و عضلات اسکلتی در پرندگان عفونی می‌گردند، در حالی‌که ویروس‌های nHPAI تنها در نای و ریه جراحاتی ایجاد می‌نمایند (۱۵). در یک مطالعه بدنبال تلقیح داخل نایی ویروس آنفلوانزای A/Chicken/Iran/۲۵۹/۱۹۹۸ (H۹N۲)، تراکئیت حاد همراه با احتقان، ادم، فقدان مژک‌ها و ریزش اپی‌تلیوم و ارتشاح هتروفیل‌ها و نکروز سلول‌های اپی‌تلیال در نای یک روز پس از تلقیح مشاهده گردید و در روزهای ۳، ۶ و ۱۰ پس از تلقیح نیز علائم التهاب لمفوسیتی در نای همراه با ارتشاح لمفوسیت‌ها، فقدان مژک‌ها و هیپرپلازی اپی‌تلیوم نیز وجود داشت و مهمترین تغییرات هیستوپاتولوژیک در روزهای ۱ تا ۱۰ پس از تلقیح ارتشاح لمفوسیت‌ها در زیرمخاط برونش‌های ثانویه و پنومونی گزارش شد (۱۱) و در مطالعه دیگر با تلقیح داخل وریدی همان ویروس H۹N۲علی‌رغم نبود جراحات بافتی در نای و ریه جوجه‌های عفونی در روزهای ۱، ۶ و ۱۰ پس از تلقیح، فقط ارتشاح ملایم لمفوسیت‌ها در زیر مخاط برونش‌های ثانویه در روز ۳ پس از تلقیح دیده شد (۱۰). Hadipour در سال ۲۰۱۰، متعاقب تلقیح ویروس H۹N۲ در جوجه‌های تجاری نژاد راس، التهاب حاد نای همراه با ادم، پرخونی، دژنرنسانس غدد مخاطی، ارتشاح هتروفیل‌ها در روز ۲ پس از تلقیح و التهاب لمفوسیتی نای، همراه با ارتشاح لمفوسیت‌ها، فقدان مژک‌ها و هیپرپلازی اپی‌تلیوم تا روز ۱۱ پس از تلقیح را گزارش نمودند. همچنین در این تحقیق مهمترین تغییرات هیستوپاتولوژی ریه از روزهای ۴ تا ۱۱ پس از تلقیح شامل ارتشاح لمفوسیت‌ها در بافت پارین برونش‌های ثانویه و پنومونی بود (۱۲).

Banani و همکاران در سال ۲۰۰۰، بدنبال تلقیح باکتری ORT در جوجه‌های گوشتی، در نای تراکئیت همراه با پرخونی، ادم، هیپرپلازی بافت پوششی و ارتشاح سلول‌های آماسی و در ریه پنومونی فیبرینی چرکی،

www.SID.ir

Archive of SID

پرخونـی، نکروز و نفوذ هتروفیل‌ها و سـلول‌های تک‌هسـته‌ای به همراه تجمع اکسودا در پارابرونشـها گزارش نمودند (۳). Pazani و همکاران در سـال ۲۰۰۸، تأثیر ویروس H۹N۲ (A/Chicken/Tehran/ -۱۷۳/۹۹ ZMT) را در جوجه‌های تجاری مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم (MG) مثبت و منفی بدنبال تلقیح داخل وریدی و یا همزمان داخل وریدی و داخل نای و چشـمی از لحاظ هیستوپاتولوژی مقایسه کردند، نتایج این پژوهشگران نشـان دهنده‌ی ارتشاح سـلول‌های التهابی تک‌هسـته‌ای در بافت پارین نای، برونش‌های ثانویه، ریه و کیسه‌های هوایی بود (۱۹). در مطالعه دیگر در مرغـان تخم‌گذار SPF نژاد لگهورن، جراحـات بافت نای گروه عفونت همزمان با ویروس برونشیت عفونی و باکتری \شریشیا کلی که تحت آلودگی ثانویه با باکتری \ورنیتوباکتریوم رینوتر\کئال بودند (IBV+*E.coli*+ORT)، نسـبت به گروه‌های انفـرادی برونشـیت عفونی (IBV) ، \شریشـیا کلی (*E.coli*) و \ورنیتوباکتریـوم رینوتر\کئـال (ORT) و گروه‌هـای همزمـان برونشـیت عفونی و \شریشـیا کلی (IBV+*E.coli*)، و برونشـیت عفونی و \ورنیتوباکتریوم رینوتر\کئال (IBV+ORT) به مراتب شدیدتر بود، همچنین مهمترین ضایعات هیستوپاتولوژی ریه در گروه‌های همزمان شامل نکروز و ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای به همراه اکسودای فیبرینی در زیر مخاط برونش‌های ثانویه بود (۲۴). Pan و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که عفونت همزمان ویروس H۹N۲ آنفلوانزا با ORT در جوجه‌های گوشتی نه تنها موجب تشدید نشانه‌های بالینی و جراحات کالبدگشایی ناشی از ویروس آنفلوانزا می‌شـود، بلکه سـبب افزایش تلفات تا میزان ۶۰ ٪ نیز می‌گردد (۱۸). Costa-Hurtado و همـکاران در سـال ۲۰۱۴ در مطالعه تجربی بـا تلقیح ویروس‌های انفلوانزا و نیوکاسـل به صـورت جداگانه و همزمان بـه جوجه‌ها و بوقلمون‌هـای SPF اقدام به بررسـی بیماریزایی و جراحات میکروسکوپی کردند و گزارش نمودند که جراحات پاتولوژی گروه همزمان نسبت به عفونت‌های جداگانه شدید می‌باشد، همچنین این مطالعات نشان داد جراحات هیسـتوپاتولوژی ناشی از گروه همزمان در بافت‌های پوششی نای، ریه، کلیه و بورس فابریسیوس شدید و طولانی مدت می‌باشد (۸).

در مطالعه حاضر در گروه‌های آزمایشـی ریـزش مژک‌ها، پرخونی و هیپرپلازی مخاط همراه با ارتشـاح تک هسـته‌ای‌ها در زیر مخاط نای و خونریزی، ادم، پنومونی همراه با ارتشـاح تک هسته‌ای‌ها و هتروفیل‌ها در زیر مخاط برنش‌های ثانویه ریه مشاهده گردید که در گروه همزمان نسبت به گروه آنفلوانزا با شـدت بیشتر و سیر طولانی‌تری تا بهبودی همراه بود. یافته‌های بدست آمد از ضایعات نای و ریه گروه آنفلوانزا با نتایج حاصل از مطالعات Hablolvarid و همکاران در سـال ۲۰۰۴، Mo و همکاران در سـال ۱۹۹۷ و Swayne and Slemons در سـال ۱۹۹۴ هم‌خوانی دارد (۲۳، ۱۵، ۱۱). افزایش شدت ضایعات در ارگان‌های تنفسی گروه همزمان بیانگر این موضوع است که ORT بعنوان عفونت ثانویه در تشدید جراحات بافتی ویروس آنفلوانزا نقش بسزایی دارد.

Swayne and Slemons در سال ۱۹۹۰، در یک مطالعه تجربی با تلقیح داخل وریدی ویروس‌های nHPAI، جراحات کلیه شامل نکروز شدید لوله‌هـای ادراری و نهایتا مرگ و میر جوجه‌های عفونی را گزارش نمودند (۲۰). مطالعات هیستوپاتولوژیکی و ایمنوهیستوپاتولوژیکی با ویروس‌های nHPAI نشان داد که نکروز توبول‌های کلیوی به ویژه لوله‌های پروگزیمال مرتبـط با تکثیر ویروس H۹N۲ می‌باشـد (۲۳). در تحقیـق دیگر پس از تلقیـح داخل وریـدی ویـروس H۹N۲ (A/Mallard/Ohio /۱۸۴/۸۶) بـه جوجه‌هـای SPF در هیسـتوپاتولوژی کلیه علایمـی از قبیل نفریت هتروفیلی چندکانونی بینابینی توبولـی و نفریت بینابینی فیبروزه همراه با آتروفی مجاری و ارتشاح کانونی تا منتشر لمفوسیت‌های بینابینی مشاهده گردید (۲۲). در مطالعات صورت گرفته توسط Hablolvarid و همکاران در سـال‌های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴، ضایعـات هیسـتوپاتولوژیک کلیه مرتبط با ویروس آنفلوانزای (H۹N۲) عفونی شده به روش‌های داخل بینی و داخل وریدی را نفریت لمفوسـیتی بینابینی لوله‌های ادراری و نفریت هتروفیلی بینابینـی توبولی همراه بـا نکروز اپی‌تلیوم مجاری تـا روز ۳ پس از تلقیح گزارش نمودنـد (۱۱، ۱۰). Thachil و همکاران در سـال ۲۰۰۹، نفریت لمفوسـیتی بینابینی همراه با کست‌های معدنی شـده در لوله‌های ادراری گروه‌های همزمـان IBV+ORT و IBV+*E.coli*+ORT مشـاهده کردند (۲۴). احتقان، نفریت بینابینی کانونی غیرچرکی به همراه نکروز و رسـوب اورات در کلیه‌هـا در اثر عفونت همزمـان ویروس H۹N۲ با باکتری MG نیز مشـاهده شده اسـت (۱۹). Bano و همکاران در سال ۲۰۰۳، با تلقیح جدایـه A/chicken/Pakistan/۳۱/۰۱ (H۹N۲) ویـروس آنفلوانـزا به ماکیان و آلودگی همزمان با برونشیت عفونی، اورنیتوباکتریم راینوتراکئال و \شریشـیا کلی گزارش کردند که ویروس آنفلوانزا به تنهایی، فقط قادر به تکثیر و ایجاد ضایعات در سلول‌های بافت پوششی سیستم تنفسی می‌باشد، اما در گروه‌های همزمان به غیر از نای و ریه‌ها در سایر بافت‌ها نظیر کلیه و بورس فابریسیوس نیز جراحات ایجاد می‌کند (۶)

در مطالعـه حاضر پرخونـی و خونریـزی و نکروز لوله‌هـای ادراری در گروه‌هـای عفونـی مشـاهده گردید که همراه با ارتشـاح سـلول‌های تک‌هسـته‌ای‌ها بود. یافته‌های گـروه آنفلوانزای تحقیـق حاضر با نتایج مطالعات پیشـین (۲۳، ۲۲، ۲۰، ۱۱، ۱۰) دارای هم‌خوانی می‌باشد و نشان دهنده شـدید و طولانی بـودن ضایعات بافت کلیه گروه همزمان نسـبت به گروه آنفلوانزا اسـت که این یافته گروه همزمان مطالعه حاضر با نتایج Pazani و همکاران در سال ۲۰۰۸، Bano و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Costa-Hurtado و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطابقت دارد (۶،۸،۱۹). به نظر می‌رسد عفونت‌های همزمان باعث تشدید شدن جراحات بافتی کلیه‌ها می‌شود.

Banani و همکاران در سال ۲۰۰۰، بدنبال عفونت تجربی با باکتری ORT در جوجه‌های گوشـتی دژنرنسـانس و نکروز انعقادی در بافت کبد

www.SID.ir

Archive of SID

جوجه تلف شده گزارش نمودند (۳). طبق مطالعات Thachil و همکاران در سال ۲۰۰۹، در گروه‌های همزمان IBV+ORT و IBV+*E.coli*+ORT، در کبد ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای و رسوب فیبرین در اطراف ورید مرکزی وجود داشت و در طحال نیز میزان متوسط تا شدید تخلیه لنفاوی و رسوب فیبرین مشاهده گردید (۲۴). آتروفی لمفوئیدی و فولیکول‌های کیستیک در بورس فابریسیوس (۱۲، ۱۰)، تخلیه لمفوسیتی در بخش قشری بافت تیموس در روزهای ۱ و ۱۰ پس از تلقیح (۱۱) و روزهای ۶ و ۱۱ پس از تلقیح (۱۲) و حضور نوکلئوپروتئین ویروس در لوزه‌های سکومی در روز ۳ پس از تلقیح (۱۱) در آلودگی با ویروس H۹N۲ گزارش شده است. طبق مطالعات Hablolvarid و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Hadipour در سال ۲۰۱۰، طحال بیشترین تغییرات هیستوپاتولوژیک را در بین بافت‌های لمفوئیدی داشت که شامل هیپرپلازی سلول‌های رتیکلوآندوتلیال و افزایش تعداد فولیکول‌های لمفوئیدی به ترتیب در روزهای ۳ و ۱۰ پس از تلقیح ویروس H۹N۲و روزهای ۱ و ۱۱ پس از تلقیح ویروس H۹N۲ بود (۱۲، ۱۱). در جوجه‌های تجاری مبتلا به عفونت مایکوپلاسما گالی سپتیکوم (MG) با تلقیح داخل وریدی و یا همزمان داخل وریدی و داخل بینی و چشمی ویروس H۹N۲، تخلیه لمفوسیتی ملایم تا متوسط، آتروفی فولیکول‌های لمفوئیدی و ادم بین فولیکولی در بورس فابریسیوس و احتقان شدید، تخلیه لمفوسیتی و نکروز کانونی در کورتکس به ویژه سلول‌های رتیکلواپیتلیال و میوسیت‌ها در مدولای لوب‌های تیموس گزارش شد (۱۹).

در مطالعه حاضر در گروه‌های عفونی، پرخونی سینوروئیدها و سیاهرگ مرکزی همراه با ارتشاح تک‌هسته‌ای‌ها در کبد، تخلیه لنفوسیتی فولیکول‌های لنفاوی در بورس فابریسیوس، افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی همراه با نکروز و ارتشاح خفیف هتروفیل‌ها در طحال، پرخونی و ارتشاح خفیف هتروفیل‌ها در بخش مرکزی تیموس و افزایش فولیکول‌های لنفاوی در لوزه‌های سکومی مشاهده گردید که یافته‌های گروه آنفلوانزا با نتایج مطالعات محققین (۲۴، ۱۲، ۱۱، ۱۰) همخوانی دارد. در گروه همزمان در مقایسه با گروه آنفلوانزا جراحات هیستوپاتولوژی کبد و بافت‌های لنفوئیدی زودتر ایجاد و مدت زمان بیشتری ادامه داشته است و همچنین از شدت بیشتری برخوردار بود که این یافته مطالعه حاضر با گزارشات پیشین عفونت‌های همزمان (۲۴، ۱۹، ۱۸، ۸، ۶، ۴) همسو می‌باشد. نتیجه‌گیری‌نهایی: نتایج این مطالعه نشان داد که آلودگی همزمان ویروس H۹N۲ آنفلوانزا با باکتری ORT سبب تشدید جراحات بافتی ناشی از ویروس H۹N۲ آنفلوانزا می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله وظیفه خود می‌دانند از آقایان دکتر عباس نوری و دکتر منصور بنانی اساتید ارجمند موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج به خاطر مساعدت در اجرای این پژوهش، کمال تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Alexander, D. J. (2007) Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. Avian Dis. 51(s1): 161-166.
2. Azizpour, A., Goudarzi, H., Charkhkar, S., Momayez, R., Hablolvarid, M. H. (2014) Experimental study on tissue tropism and dissemination of H9N2 avian influenza virus and *Ornithobacterium rhinotracheale* co-infection in SPF chickens. J Anim Plan Sci. 24(6):1655-1662.
3. Banani, M., Khaki, P., Goudarzi, H., Vand-Yousefi, J., Pourbakhsh, S.A. (2000) Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a broiler and a pullet flock. Pajouhesh Va Sazandegi. (In Persian) 46: 106-109.
4. Banani, M., Momayez, R., Pourbakhsh, S.A., Goodarzi, H., Bahmani Nejad, M.A. (2002) Simulataneous isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* and avian influenza virus subtype H9H2 from commercial poultry. Iran J Vet Res. 3(2): 100-115.
5. Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Ghodsian, N., Karimi, V., Ashtari, A. (2011) The phylogenetic analysis of some *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chicken flocks in Iran. GenBank: JF810491.
6. Bano, S., Naeem, K., Malik, S.A. (2003) Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9H2 in Chickens. Avian Dis. 47(3 Suppl): 817-822.
7. Bijanzad, P., Momayez, R., Bozorgmehrifard, M.H., Hablolvarid, M.H., Pourbakhsh, S.A. (2013) Experimental study on histopathological changes and tissue tropism of iranian infectious bronchitis serotype 793/B-Like virus in spf chickens. J South Afr Vet Assoc. 84 (1): 1 -7.
8. Costa-Hurtado, M., Afonso, C.L., Miller, P.J., Spackman, E., Kapczynski, D.R., Swayne, D.E., Shepherd, E., Smith, D., Zsak, A., Pantin-Jackwood. (2014) Virus interference between H7N2 low pathogenic avian influenza virus and lentogenic Newcastle disease virus in experimental co-infections in chickens and turkeys.Vet Res. 45:1
9. Goudarzi, H., Azizpour, A., Banani, M., Nouri,

www.SID.ir

Archive of SID

A., Seifi, S. (2015) Survey of tissue tropism and dissemination of ORT-R87-7/1387 strain of *Ornithobacterium rhinotracheale* in SPF chickens. Pajouhesh Va Sazandegi. (In Persian) 27: 2-8.

10. Hablolvarid, M. H., Sohraby Haghdost, I., Pourbakhsh, S. A., Gholami, M. R. (2003) Study on histopathologic changes in chicken following intravenous inoculation with avian influenza virus a/chicken/Iran/259/1998(H9N2). Arch Razi Inst. 55(1): 41-54.
11. Hablolvarid, M. H., Sohraby Haghdost, I., Pourbakhsh, S. A., Gholami, M. R. (2004) Histopathological study of intranasally inoculated a/chicken/Iran/259/1998(H9N2) Influenza Virus in Chicken. Arch Razi Inst. 58: 51-62.
12. Hadipour, M.M., Farjadian, S.H., Azad, F., Kamravan, M., Dehghan, A. (2011) Nephropathogenicity of H9N2 avian influenza virus in commercial broiler chickens following intratracheal inoculation. J Anim Vet Adv. 10(13):1706-1710.
13. Haghighat-Jahromi, M., Asasi, K., Nili, H., Dadras, H., Shooshtari, A.H. (2008) Coinfection of avian influenza virus (H9n2 Subtype) with infectious bronchitis live vaccine. Arch Virol. 53(4): 651-655.
14. Mosleh, N., Dadras, H., Mohammadi, A. (2009) Evaluation of H9N2 avian influenza virus dissemination in various organs of experimentally infected broiler chickens using RT-PCR. Iranian J Vet Res. 10(1): 12-20.
15. Mo, I.P., Brugh, M., Fletcher, O. J., Rowland, G. N., Swayne, D.E. (1997) Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. Avian Dis. 41(1): 125-136.
16. Naeem, K., Ullah, A., Manvell, R.J., Alexander, D.J. (1999) Avian influenza a subtype H9H2 in poultry in pakistan. Vet Rec. 145(19): 560-565.
17. Nili, H., Asasi, K. (2003) Avian influenza (H9n2) outbreak in Iran. Avian Dise. 47(3 Suppl): 828-831.
18. Pan, Q., Liu, A., Zhang, F., Ling, Y., Ou, C., Hou, N., He, C. (2012) Co-infection of broilers with *Ornithobacterium rhinotracheale* and H9N2 avian influenza virus. BMC. Vet Res. 8:104. doi:10.1186/1746-6148-8-104.
19. Pazani, J., Vasfi-Marandi, M., Ashrafihelan, J., Marjanmehr, S. H., Ghods, F. (2008) Pathological studies of a / chicken / Tehran / Zmt - 173/99 (H9N2) influenza virus in commercial broiler chickens of Iran. Inter J Poul Scie. 7: 55-63.
20. Slemons, R. D., Swayne, D. E. (1990) Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. Avian Dis. 34(2): 277-284.
21. Swayne, D.E., Suarez, D.L., Sims, L.D. (2013) Influenza. In: Diseases of Poultry. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Venugopal, N. (eds.). (13th ed.) Wiley-Blackwell, Ames, USA. p. 181-218.
22. Swayne, D. E., Slemons, R. D. (1990) Renal pathology in specific-pathogen-free chickens inoculated with a waterfowl-origin type a influenza virus. Avian Dis. 34(2): 285 -294.
23. Swayne, D. E., Slemons, R. D. (1994) Comparative pathology of a chicken-origin and two duck-origin influenza virus isolates in chickens: the effect of route of inoculation. Vet Pathol. 31(2): 237-245.
24. Thachil, A.J., Velayudhan, B.T., Shaw, D.P., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V. (2009) Pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* in egg-laying hens with coexisting infectious bronchitis virus and *Escherichia coli* infections. J Appl Poult Res. 18:780-788.
25. Van Empel, P., Hafez, H.M. (1999) Ornithobacteriumrhinotracheale: a review. Avian Dis. 28: 217- 227.
26. Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri Fard, M. H. (2002) Isolation of H9N2 subtybe of avian influenza viruses during outbreak in chickens in Iran. Iran Biomed J. 6: 13-17.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Research. 73,2:199-207,2018 Original Article

An Experimental Study of Histopathological Lesions Caused by H9N2 Subtype of Avian Influenza Virus and *Ornithobacterium Rhinotracheale* Co-Infection

Azizpour, A.[1*], Goudarzi, H.[2], Charkhkar, S.[3], Momayez, R.[2], Hablolvarid, M.H.[3], Bijanzad, P.[3]

[1]*Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*
[2]*Department of Avian Diseases Research and Diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*
[3]*Department of Poultry Diseases, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[4]*Department of Pathology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*
[5]*Department of Clinical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran*
(Received 4 February 2018, Accepted 12 May 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Avian influenza virus H9N2 subtype and *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) causes histopathological lesions in birds. Yet, there is not any study on tissue lesions caused by these pathogens co-infection in specific pathogen free (SPF) chicks. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the type, severity and extent of histopathological lesions induced by co-infection of H9N2 subtype avian influenza virus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in SPF chickens. **METHODS:** Sixty, one-day-old SPF chicks were divided randomly into three groups of twenty. At 21 days, the chicks in the first group were infected with H9N2 subtype AI virus and the second group was inoculated with H9N2 subtype AI virus and ORT simultaneously. The third group was inoculated with PBS as control. Then, three birds from each group were randomly selected and euthanized and autopsied at 2 till 16 days post-inoculation (DPI). The tissue samples were collected from trachea, lungs, liver, spleen, thymus, kidneys, cecal tonsil and bursa of fabricius. They were cut into 5 to 6 µm thickness sections using paraffin embedding method and were stained by Hematoxylin and Eosin (H&E). **RESULTS:** The severity of histopathological lesions in the second group was higher than first group. Tissue changes were not observed in control group. **CONCLUSIONS:** The results of this study showed that infected chickens with H9N2 subtype AI virus and ORT simultaneously cause exacerbated histopathological lesions compared to H9N2 subtype of AI virus.

Keyword: Avian influenza virus, ORT, histopathological lesions, SPF chickens

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Histopathological lesions of the trachea, lung, kidney and liver in 3 groups.

Table 2. Histopathological lesions of bursa of fabricius, spleen, thymus and cecal tonsil in 3 groups.

Figure 1. Air sacculitis in the bird of co-infection group on day 2 PI.

Figure 2. Hyperplasia of the connective tissue in trachea of co-infection group on day 6 PI.

Figure 3. Congestion, edema and exudative fibrin in the duct in trachea of died bird of co-infection group on day 2 PI.

Figure 4. Pneumonia, congestion and edema associated with necrosis and infiltration of leukocytes in lungs of died bird of co-infection group on day 3PI.

Figure 5. Congestion, hemorrhage and nephrit, urinary tracts necrosis and infiltration of leukocytes in kidney of died bird of co-infection group on day 3PI.

Figure 6. Congestion in sinusoidal and mononuclear infiltration in parenchyma in liver of died bird of co-infection group on day 2 PI.

Figure 7. Lymphocyte depletion of follicles in bursa of fabricius in bird of co-infection group on day 16 PI.

***Corresponding author's email: aidin_azizpour@uma.ac.ir, Tel: 045-32545621, Fax: 045-32545623**
www.SID.ir