مطالعه تجربی عفونت همزمان ویروس آنفلوانزایH9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در جوجه‌های SPF

آیدین عزیزپور*[۱]، حسین گودرزی[۲]، سعید چرخکار[۳] ، رضا ممیز[۲]، محمدحسن حبل‌الورید[٤]

چکیده

در این مطالعه بیماریزایی عفونت همزمان ویروسH9N2 (A/chicken/Iran/m.1/2010) و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT- R87-7/1387) و تمایل این عفونت به بافت های مختلف و همچنین انتشار آن در بدن جوجه های نژاد لگهورن SPF، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین علایم بالینی و ضایعات کالبدگشایی در پرندگان مبتلا ارزیابی شد. چهل قطعه جوجه تفریخ شده از تخم مرغ جنین دار SPF در سن ۲۱ روزگی به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند (۲۰ قطعه در گروه آزمایش و ۲۰ قطعه در گروه کنترل). در سن ۳ هفتگی جوجه های گروه آزمایش، همزمان به روش قطره چشمی به ویروس H9N2 با عیار 10^6 EID50 و باکتری ORT به روش داخل نای به مقدار CFU ^{10} ۱×۱۰ آلوده شدند. نمونه گیری از بافت های مختلف در روزهای ۲، ٤،٦،۸،۱۰،۱۲و۱٤ بعد از آلوده سازی انجام شد. در این مطالعه به منظور بررسی روند انتشار ویروس از روش جداسازی ویروس از طریق تلقیح به تخم مرغ های SPF جنین‌دار۱۱ روزه و کشت باکتریایی از سوآب های اخذ شده بر روی محیط کشت آگار خوندار استفاده گردید. جوجه های گروه آزمایش افسردگی، کم اشتهایی، ژولیدگی پرها، علایم شدید تنفسی و 15 درصد تلفات نشان دادند. بیشترین علایم بالینی در روز ۳ بعد از تلقیح مشاهده گردید. باکتری ORT از سوآب نای در روزهای ۲ و ٤ پس از تلقیح و از ریه در روز ٤ پس از تلقیح جداسازی گردید. اما وجود باکتری در سوآبهای کبد و قلب در طی کل دوره مطالعه ردیابی نشد. ویروس آنفلوانزا در روزهای ۲ و ٤ بعد از تلقیح در ریه و نای جداسازی گردید. همچنین ویروس در روزهای ۲ و ٦ بعد از چالش در بورس فابریسیوس ردیابی شد. ویروس تنها در روز ۲ پس از تلقیح در نمونه های تیموس وکبد و روز ۸ پس از تلقیح در کلیه های پرندگان مبتلا جداسازی شد. درحالیکه در طی کل دوره مطالعه، ویروس در طحال، لوزه های سکومی و کلوآک یافت نشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری و ویروس به ترتیب از روزهای ٦ و۱۰ پس از تلقیح از هیچ ارگانی جداسازی نشد و همچنین آلودگی همزمان ویروس H9N2 و باکتری ORT منجر به بروز علائم شدید بالینی و ضایعات کالبدگشائی در جوجه‌های دچار عفونت شد..

واژگان کلیدی: *ویروس آنفلوانزای H9N2، اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، عفونت همزمان، تمایل بافتی، جوجه های SPF*

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱٤

مقدمه

آنفلوانزای طیور بیماری ویروسی از خانواده اورتومیکسویریده است که تنها تیپ A آن در پرندگان ایجاد عفونت طبیعی می‌نماید(۲٦و ۲، ۱).تحت تیپ های ویروس آنفلونزای نوع A بر اساس دو گلیکو پروتئین هماگلوتینین(HA) و نورآمینیداز(NA) تعیین می شود که تاکنون ۱٦نوع HA و ۹نوعNA شناسایی شده است (۲٦و ۲).دامنه وسیعی از حدت در ویروس‌های آنفلوانزا پرندگان وجود داردکه از یک عفونت بدون علائم بالینی تا ظهور صددرصد تلفات در پرندگان حساس متغیر می‌باشد(۳۲و ۳۰، ۲٦). عموماً آلودگی ماکیان و بوقلمون با ویروس‌های با حدت کم منجر به ظهور علائم خفیف تنفسی، کاهش میزان تولید تخم‌مرغ و در بعضی موارد تلفات کم می‌شود(۳۲). درطی ده سال اخیر، ویروس‌های آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 از موارد همه‌گیری در کشورهای مختلف نظیر ایران، آلمان، ایتالیا، ایرلند، عربستان سعودی، پاکستان، چین، هنگ‌کنگ، آفریقای جنوبی، و ایالات متحده جداسازی و گزارش شده است (۳۲و۲۷، ۲٦، ۸، ۳، ۱)

این ویروس‌ها به تنهایی در شرایط تجربی و طبیعی فقط قادر به ایجاد بیماری خفیف می‌باشند، در صورتی که با حضور و تداخل سایر میکروارگانیسم‌ها یا عوامل نامساعد محیطی می‌توانند موجب وخیم‌تر شدن بیماری و تلفات بالا شوند(۲٦). بطوریکه تشدید بیماریزایی تحت تیپ H9N2 ویـروس آنفلوانـزای A جدا شده از جوجه های بیمار توسـط

۱*ـ دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشجوی دکترای تخصصی بیماریهای طیور، تهران، ایران.
aidin_azizpour@yahoo.com
۲ـ استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک کرج ، ایران.
۳ـ دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه بیماریهای طیور، تهران، ایران.
٤ـ استادیار بخش پاتولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک کرج ، ایران.

Archive of SID
www.SID.ir

عفونت همزمان با ویروس واکسن زنده برونشیت عفونی و باکتریهایی نظیراستافیلوکوک طلایی و هموفیلوس پاراگالیناروم به اثبات رسیده است (۱۶و ۱۳). همچنین در سال‌های اخیر محققین وجود عفونت همزمان ویروس آنفلونزای تحت تیپ H9N2 و باکتری ORT را در کمپلکس‌های تنفسی با تلفات زیاد در کشور تایید و گزارش نموده‌اند (۵). با این وجود مطالعات کاملی بر روی عفونت همزمان این دو عامل انجام نگرفته است، از این‌رو ویژگی‌های بیماریزایی و انتشار بافتی در عفونت همزمان ویروس H9N2 و باکتری ORT به وضوح توصیف نگردیده است.

هدف از مطالعه حاضر بررسی ویژگی‌هایی بیماریزایی عفونت همزمان ویروس H9N2 و باکتری ORT در جوجه‌های SPF و مشخص نمودن گرایش بافتی و انتشار این عفونت همزمان می‌باشد. علائم بالینی و ضایعات کالبدگشایی نیز همزمان با شناسایی باکتری و ویروس در اندام‌های مختلف جوجه‌های آلوده شده با استفاده از آزمایشات کشت و جداسازی ارزیابی خواهند شد.

مواد و روش کار

آماده سازی نمونه های تلقیح

ویروس H9N2

در این مطالعه ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 (A/chicken/Iran/m.1/2010) مورد استفاده قرار گرفت. عیار ویروس با تلقیح ۰/۲ میلی‌لیتر از رقت های متوالی بر مبنای یک دهم (10^{-2} –10^{-9}) بذر ویروسی در PBS در داخل فضای کورویوالانتوئیک تخم مرغ های جنین‌دار ۱۱ روزهSPF محاسبه گردید. بطوریکه هر رقت مورد نظر در ۳ تخم مرغ در زیر هود کلاس II تلقیح و بعد از انتقال به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز نگهداری شدند. تخم مرغ‌های جنین‌دار SPF تلقیح شده دوبار در روز جهت بررسی وضعیت جنین تحت نوربینی قرار گرفتند. مرگ جنین طی ۲٤ ساعت اول حاصل عفونت باکتریائی بود و این جنین‌ها حذف گردیدند. اما۲ تا ۷ روز بعد از تلقیح اختصاصی ویروس، تخم مرغ‌هایی که جنین‌هایی آنها مرده بود به یخچال ^{oC} ٤ منتقل و مایع‌های آلانتوئیک آن‌ها در شرایط استریل برداشت شد و در درجه حرارت کمتر از ٤۰– درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. در پایان روز ۷ پس از تلقیح، مایع آلانتوئیک جنین‌های تلف شده با آزمایش‌های HA و HI مورد بررسی قرار گرفتند. عیار ویروس بصورت ۵۰ درصد دوز عفونی کننده جنین (EID50) و به روش اسپرمن ـ کاربر محاسبه شد(۳۳).

باکتری ORT

جدایه ایرانی باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال با مشخصات ORT-R87-7/1387(JF810491) در بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های باکتریایی طیور موسسه رازی انتخاب و استفاده شد. این جدایه بوسیله آزمایش های PCR و ERIC-PCR مورد شناسایی قرار گرفته است و میزان باکتری به‌صورت 1×10^{10} CFU به روش Reed and Muench (۱۹۳۸) محاسبه شد(۲٤).

پرندگان

چهل قطعه جوجه SPF نژاد لگهورن بصورت تصادفی در دو گروه ۲۰ قطعه‌ای توزیع گردید. جوجه‌های هر گروه بصورت جداگانه در داخل ایزولاتورهای (ساخت کشور اسکاتلند Bell Isolation System) مجزا در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی کرج در شرایط کنترل شده نگهداری شدند (نگاره‌های ۱و۲).

نگاره ۱ـ دستگاه ایزولاتور(Bell Isolation System) استفاده شده در مطالعه حاضر

Archive of SID

www.SID.ir

نگاره ۲ـ جوجه های SPF نژاد لگهورن نگهداری شده در داخل دستگاه ایزولاتور

شرایط آزمایش

در سن ۲۱ روزگی تمامی پرندگان در گروه آزمایش بطور همزمان به میزان EID50 10^6 در ۰/۱ سی سی از مایع کوریوالانتوئیک عفونی حاوی ویروس H9N2 به روش قطره چشمی و CFU $10^{10}\times1$ در ۰/۵ سی‌سی حاوی باکتری ORT به روش داخل نای تلقیح شدند. گروه دوم نیز بعنوان گروه کنترل انتخاب و صرفاً مایع آلانتوئیک به روش قطره چشمی جهت تلقیح استفاده گردید. تا دو هفته پس از تلقیح تمامی جوجه‌ها از نظر علائم بالینی و تلفات روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. در روزهای ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ ، ۱۲ و ١٤ پس از تلقیح، سه جوجه از هر گروه بصورت تصادفی انتخاب گردید و بعد از کالبدگشایی سوآب و نمونه‌برداری انجام گرفت و همچنین علائم کالبدگشایی نیز در صورت موجود بودن ثبت گردید. نمونه‌ها از بافت‌های مختلف شامل نای، تیموس، ریه‌ها،کبد، طحال، کلیه‌ها، لوزه‌های سکومی، بورس فابریسیوس، و کلوآک حاوی مدفوع جهت شناسایی ویروس H9N2با استفاده از روش جدا سازی اخذ گردید و همچنین در حین نمونه برداری از بافتهای مختلف سوآب‌های نای، ریه قلب و کبد جهت ردیابی باکتری ORT جمع آوری شد. لازم بذکر است که نمونهای بافتی با دستگاه آسیاب کننده بافت جهت انجام عملیات جداسازی ویروس صلایه گردید و سپس با افزودن بافر نمکی فسفاته(PBS) به نسبت ۱۰ درصد به صورت سوسانسیون هموژنیزه در آمد.

کشت و جداسازیORT

نمونه سواب های جمع آوری شده در هر نوبت بلافاصله بر روی محیط کشت آگار خوندار حاوی۵ درصد خون گوسفند، جنتامایسن و پلی میکسینB (۵ میکروگرم به ازاء هر میلی لیتر، به منظور مهار رشد باکترهای مزاحم ناخواسته)کشت داده شدند و در انکوباتور ۷ تا ۱۰ درصد CO2 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤۸ ساعت نگهداری می شدند. کلنی های باکتریایی مشاهده شده نیز بر اساس شکل و رنگ پرگنه، رنگ آمیزی گرم و برخی خواص بیوشیمیایی نظیر اکسیداز وکاتالاز مورد شناسایی و تشخیص قرار می‌گرفتند. (نگاره ۳)(۱۳و ۹، ٤).

نگاره ۳ـ رشد کلونی های باکتریORT در مدت ٤۸ ساعت در محیط آگار خوندار،داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد.

جداسازی H9N2

از نمونه های صلایه و هموژنیزه شده به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر در داخل فضای کورویوالانتوئیک تخم مرغ های جنین‌دار ۱۱ روزهSPF تلقیح شد. تخم مرغها به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و هر روز دوبار تحت نوربینی قرار گرفتند. تلفات جنینی ۲ تا ۷ روز بعد از تلقیح ویروس

Archive of SID

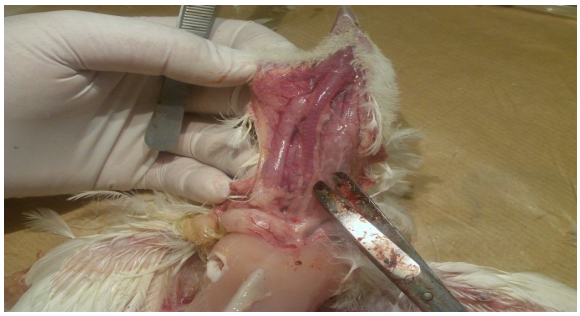
www.SID.ir

ثبت و در یخچال نگهداری می شدند. در پایان روز ۷ پس از تلقیح، مایع کورویوالانتوئیک تمام تخم مرغهایی که جنین آنها تلف شده بود در شرایط استریل اخذ و با تست هماگلوتیناسیون سریع آزمایش شدند که در صورت مثبت بودن تست جهت مشخص کردن عیار ویروس، آزمایش هماگلوتیناسیون اجرا و آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون با آنتی سرم های اختصاصی نیوکاسل و آنفلوانزای تحت تیپ H9 انجام شد. آن تعداد از مایع آلانتوئیک که از نظر آنفلوانزا منفی شدند، جهت اطمینان از منفی بودن آنها مجددا در پاساژ دوم به تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شدند(۳۲و ۲۳).

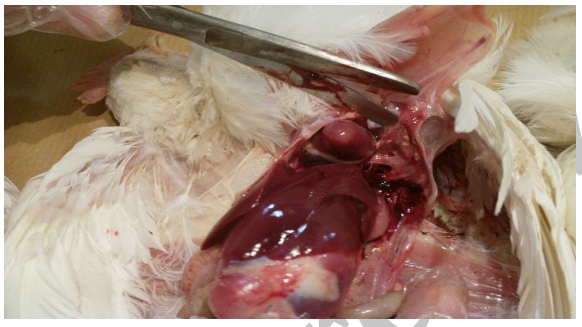
نتایج

علائم بالینی و کالبدگشایی

تعدادی از جوجه‌های مربوط به گروه آلوده شده از روز دو پس از تلقیح دچار کم اشتهایی، ژولیدگی پرها، کزکردگی و مشکل شدید تنفسی(با دهان باز تنفس کردن) گردیدند و در این روز نیز یک جوجه دارای تاج و ریش سیانوزه بود. بیشترین علایم بالینی در روز ۳ بعد از تلقیح مشاهده گردید، اما علایم از روز ششم پس از تلقیح بسیار کم شد. بطوریکه علایم ملایم تنفسی و کزکردگی داشتند و از روز دوازدهم پس از تلقیح هیچ گونه علایم بالینی مشاهده نگردید. در طی مطالعه سه قطعه تلفات درگروه آلوده شده به ترتیب در روزهای ۲ ،۳ و ۵ پس از تلقیح مشاهده گردید. در کالبدگشایی جوجه ها علایم پرخونی ملایم تا شدید نای، تورم کیسه‌های هوایی و پنومونی وجود داشت. در جوجه تلف شده روز دوم بعد از تلقیح، التهاب و پرخونی شدید نای، تورم کسیه‌های هوایی، تورم کلیه ها، پنومونی یک طرفه؛جوجه تلف شده روز سوم بعد از تلقیح، پرخونی ملایم نای، تورم کلیه‌ها و کبد، چرکی شدن کیسه‌های هوایی و وجود کیست پنیری در محل دو شاخه شدن نای و جوجه تلف شده روز پنجم بعد از تلقیح، تورم و چرکی شدن کیسه های هوایی و التهاب ملایم نای مشاهده گردید. همچنین میزان مصرف دان و افزایش وزن در مقایسه با گروه شاهد در گروه آلوده شده کاهش یافت. در جوجه‌های گروه کنترل هیچ گونه علایم بالینی، ضایعات کالبدگشایی و تلفات مشاهده نگردید (نگاره‌های ٤و٥).



نگاره ٤ـ پرخونی شدید نای در جوجه تلف شده گروه عفونی در ۲ روز پس از تلقیح



نگاره ٥ـ تورم و چرکی شدن کیسه های هوایی در جوجه تلف شده گروه عفونی در ۳ روز پس از تلقیح

شناسایی ویروس و باکتری در بافت‌ها متعاقب تلقیح

جهت بررسی حضور ویروس و باکتری در بافت‌ها، تمامی نمونه‌های اخذ شده از هر دو گروه مورد مطالعه در روزهای مختلف پس از تلقیح مورد آزمایش قرار گرفتند. در نمونه‌هایی که قبل از تلقیح اخذ گردیده بودند و همچنین نمونه‌های اخذ شده از گروه کنترل ویروس و باکتری شناسایی نگردید. نتایج کشت باکتری ORT از سوآب های اخذ شده در جدول ۱ آورده شده است. بطوریکه باکتری در

Archive of SID

www.SID.ir

سوآب نای در روزهای ۲ و ٤ پس از تلقیح و در ریه ٤ روز پس از تلقیح جداسازی گردید. اما باکتری در سوآبهای کبد و قلب در طی کل دوره مطالعه جداسازی نشد. ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 در تمامی نمونه‌های اخذ شده از گروه عفونی شده به استثناء بافت طحال، لوزه های سکومی و کلوآک در روزهای مختلف پس از تلقیح شناسایی گردید. انتشار ویروس در اندام‌های مختلف پس از تلقیح نیز در جدول ۲ ذکر شده است. بطور خلاصه در ریه و نای، ویروس از روز ۲ تا ٤ پس از تلقیح جداسازی گردید. در بورس فابریسیوس از روزهای ۲ و ٦ پس از تلقیح و در نمونه‌های مربوط به تیموس وکبد ویروس فقط در روز ۲ پس از تلقیح شناسایی شد. همچنین تنها نمونه مثبت مربوط به بافت کلیه نیز در روز ۸ پس از تلقیح ثبت گردید.

جدول ۱-نتایج کشت باکتری ORT در نمونه های سوآب پس از تلقیح همزمان H9N2 و ORT

روز پس از تلقیح	۲	٤	٦	۸	۱۰	۱۲	۱٤
نای	+	+	-	-	-	-	-
ریه	-	+	-	-	-	-	-
قلب	-	-	-	-	-	-	-
کبد	-	-	-	-	-	-	-

* +: نمونه‌های مثبت، - نمونه‌های منفی

جدول ۲- نتایج حضور ویروس H9N2 در بافت‌های مختلف پس از تلقیح همزمان H9N2 و ORT

روز پس از تلقیح	نای	تیموس	ریه	کبد	طحال	کلیه‌ها	لوزه‌های سکومی	بورس فابریسیوس	کلوآک
۲	+	+	+	+	-	-	-	+	-
٤	+	-	+	-	-	-	-	-	-
٦	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۸	-	-	-	-	-	+	-	-	-
۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۲	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱٤	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* +: نمونه‌های مثبت، - نمونه‌های منفی

بحث

سندرم تنفسی یکی از مشکلات مهم در صنعت طیور کشور در دوران پرورش به ویژه در گله‌های طیور گوشتی می‌باشد. عوامل مختلف ویروسی و باکتریائی از قبیل ویروس‌های نیوکاسل (به استثنای سویه‌های Velogenic)، آنفلوانزای طیور، برونشیت عفونی، پنوموویروس‌ها و باکتری‌های E.coli ، ORT و مایکوپلاسماها می‌توانند در ایجاد این سندرم نقش داشته باشند. تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای پرندگان در گروه با بیماریزائی پائین (LPAI) طبقه بندی می‌گردد(۲٦) که اولین رخداد این ویروس در ایران مربوط به سال ۱۳۷۷ می‌باشد که توسط وصفی مرندی و بزرگمهری‌فرد از مزارع مرغ تخمگذار جداسازی شد(۳۱). سپس همه‌گیری وسیع آن در جوجه‌های گوشتی تجاری توسط نیلی و اساسی در سال ۲۰۰۳ گزارش گردید(۲۲) و از آن زمان تاکنون این بیماری تبدیل به یکی از بیماریهای مهم تنفسی صنعت طیور کشور گردیده است. بطوریکه در طی

Archive of SID

www.SID.ir

این چند سال اخیر به صورت اپیدمی شدید با تلفات زیاد به ویژه در نیمچه‌های گوشتی دراکثر مرغداری‌های صنعتی کشور همانند کشورهای آسیایی و خاورمیانه (۲۱و ۱۱، ۱۰، ۷) گزارش گردیده است. علت تلفات بالای ناشی از این ویروس دقیقاً مشخص نیست زیرا بر اساس مطالعات مختلف، ویروس آنفلوانزا به تنهائی موجب عوارض مهمی در گلهٔ طیور نمی‌شود (۲۹و ۲٦). اما براساس گزارش‌های علمی، عوامل مختلفی از قبیل مشکلات مدیریتی، استرس‌های محیطی و عفونت های همزمان باکتریائی و ویروسی در تشدید عوارض و تلفات دخیل هستند (۱۷و۱٤). یکی از این عوامل باکتریائی در کمپلکس تنفسی صنعت طیور، باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال می باشد که اولین بار در ایران توسط بنانی و همکاران در سال ۱۳۷۹ از یک گله جوجه گوشتی و گله پولت تخم گذار که علایم تنفسی داشتند در موسسه رازی کرج جداسازی و شناسایی شد(٤). متعاقبا این باکتری از بوقلمون و سایر نژاد های ماکیان توسط این محققین نیز گزارش گردید(۹و٦). مطالعات انجام شده نشان داد که برخی سویه های باکتری ORT به تنهایی در جوجه های SPF قادر به ایجاد تظاهرات بالینی بیماری می باشد و در صورت ظهور شرایط مستعد کننده نظیر ابتلا به عفونت های ویروسی و باکتریایی منجر به تشدید بیماریزایی سایر عوامل بیماریزای مرتبط خواهد شد(۲۸و ۱۸، ۱۰، ٦). همچنین آلودگی همزمان ویروس آنفلونزای تحت تیپ H9N2 و باکتری ORT از ۲٦ گله صنعتی مبتلا به اختلالات شدید تنفسی و تلفات زیاد در طی سال ۱۳۷۹ توسط محققین موسسه رازی تایید و گزارش شد(۵). اگرچه بیماریزایی ویروس H9N2 با استفاده از روش‌های مختلفی بررسی گردیده است(۲۵و ۲۰، ۱٦، ۱۵، ۱۲)، اما هدف مطالعه حاضر بررسی روند بیماریزایی، گرایش و انتشار بافتی و همچنین علایم بالینی و کالبدگشایی آلودگی همزمان ویروس H9N2 و باکتری ORT در جوجه های SPF بوده است.

نتایج حاصل از مطالعه Pan و همکاران (۲۰۱۲) بطور تجربی در جوجه های گوشتی SPF نشان دهنده بروز علائم بالینی کم اشتهایی و ژولیدگی پرها در روز ۲ پس از تلقیح، درگیری شدید تنفسی ولاغری در روز ۳ پس از تلقیح و افزایش تلفات در طی روزهای ۳ تا ۵ پس از تلقیح و همچنین علایم کالبدگشایی از قبیل پرخونی و خونریزی منتشره در مجرای تنفسی(نای و ریه ها)، تورم کسیه های هوایی، پریکاردیت و پنومونی جوجه‌های آلوده شده به عفونت همزمانH9N2 و باکتری ORT بود(۲۳). حقیقت جهرمی و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که عفونت همزمان ویروس آنفلوانزای H9N2 با ویروس واکسن زنده برونشیت عفونی (سویه H120) نه تنها موجب تشدید علایم بالینی و کالبدگشایی ناشی از ویروس آنفلوانزا می‌شود، بلکه موجب افزایش میزان تلفات و طولانی شدن دوره دفع ویروس آنفلوانزا نیز در جوجه‌های گوشتی می‌گردد(۱٤). در مطالعه حاضر نشانی بالینی کزکردگی، ژولیدگی پرها، مشکل شدید تنفسی و کاهش وزن‌گیری و علایم کالبدگشایی، التهاب و پرخونی نای، تورم و چرکی شدن کسیه های هوایی و پنومونی در مقایسه با گروه شاهد بود که با نتایج حاصل از مطالعات پژوهشگران همسو می‌باشد(۲۸و ۱۸، ۱٤).

مصلح و همکاران (۲۰۰۹) با تلقیح داخل بینی تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا مشخص کردند که می‌توان ریبونوکلئیک اسید (RNA) ویروس را از نای، ریه‌ها و طحال در طی روزهای ۳ و ٦ پس از تلقیح، کلیه‌ها در روزهای ۳، ٦ و۹ پس از تلقیح و مدفوع فقط در روز ٦ پس از تلقیح جدا نمود، ولی این محققین نتوانستند ویروس را از خون و پانکراس جداسازی نمایند، همچنین مشخص شد که در روز ٦ پس از تلقیح، تعداد پرندگان دچار عفونت و اندام‌های دارای ویروس بیش از سایر روزهای مطالعه (۳ و ۹ روز پس از تلقیح) بود و از نتایج قابل توجه؛ توانایی تکثیر ویروس در بافت کلیه همزمان با افزایش تیتر آنتی‌بادی و بهبودی ماکیان بود(۲۰).

Archive of SID

www.SID.ir

وُن و همکاران (۲۰۰۸) با مطالعه ویروس A/Chicken/HS/K5/01(H9N2) گزارش نمودند که آنتی‌ژن‌های ویروسی در کلیه‌ها، طحال، نای، ریه‌ها، تیموس، بورس فابریسیوس و لوزه‌های سکومی در جوجه‌های SPF، دچار تضعیف سیستم ایمنی با سن سه هفته، ۵ روز پس از تلقیح قابل جداسازی است(۱۵). همچنین گزارش شده است که تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای با بیماریزایی پائین از کلیه‌ها و طحال طیور تخمگذار تجاری در سن ۳۵ هفتگی شناسایی و جداسازی شده است(۱٦). شمس‌الدینی و همکاران (۲۰۰۲) آنتی‌ژن ویروسی H9N2 را با استفاده از آزمایش ایمنوپراکسیداز در نای، ریه‌ها، و کلیه‌های جوجه‌های گوشتی نژاد آرین در سن ٦ هفتگی شناسایی نمود(۲٦). در مطالعه ایمنوهیستوپاتولوژیکی حبل‌الورید و همکاران (۲۰۰٤) در جوجه‌های SPF آلوده شده به روش تجربی در سن ۵ هفتگی با ویروس A/Chicken/Iran/259/1998(H9N2)، نوکلئوپروتئین ویروس در نای، ریه‌ها، و لوزه‌های سکومی جوجه‌های تلقیح شده شناسایی شد(۱۲). در مطالعه حاضر نیز ویروس از روزهای ۲ تا ٤ پس از تلقیح در ریه و نای ، روزهای ۲ و ٦ پس از تلقیح در بورس فابریسیوس و روز ۲ پس از تلقیح در تیموس و کبد شناسایی گردید و همچنین تنها نمونه مثبت مربوط به بافت کلیه نیز در روز ۸ پس از تلقیح ثبت گردید که نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج مطالعات پیشین مشابهت دارد (۲۵و ۲۰، ۱۹، ۱٦، ۱۵).

اگرچه حضور ویروس H9N2 در طحال، لوزه‌های سکومی وکلوآک قبلاً گزارش شده است(۲۰و ۱۵، ۱۲)، اما در این مطالعه ویروس از طحال، لوزه‌های سکومی وکلوآک حضور نداشت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری و ویروس به ترتیب از روزهای ٦ و۱۰ پس از تلقیح در هیچ ارگانی جداسازی نشد و همچنین آلودگی همزمان ویروس H9N2 و باکتری ORT منجر به ۱۵ درصد تلفات و بروز علائم شدید بالینی و کالبدگشائی در جوجه‌های دچار عفونت گردید. با توجه به اهمیت عفونت همزمان پیشنهاد می گردد که نقش سایر عوامل بیماریزا نظیر ویروس برونشیت عفونی، ایشریشیا کولی و مایکوپلاسما در عوارض حاصل از بیماری بررسی گردد تا در استراتژی مبارزه و پیشگیری از بیماری کمپلکس تنفسی وکاهش زیان‌های اقتصادی ناشی از آنها مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و سپاسگزاری

از زحمات و همکاری های ویژه اساتید ارجمند موسسه رازی جناب آقای دکتر عباس نوری به خاطر کمک و مساعدت در مراحل مختلف اجرای آزمایش و جناب آقای دکتر منصور بنانی به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه باکتری نقش بسزایی در اجرای این تحقیق داشتند، کمال تشکر و قدردانی می شود. همچنین از زحمات آقایان سید غلامرضا میرزائی و محسن محمود زاده تشکر می‌شود.

فهرست منابع

۱- عزیزپور، آ.(۱۳۹۰): مروری بر بیماری آنفلوانزای پرندگان، فصلنامه علمی-تخصصی طیور، چکاوک، ۲۰(۱): ٤۷-۳۵.

۲- عزیزپور، آ.، بکائی، س.، شیخی، ن.، حبیب زاده،ش. (۱۳۹۱): بررسی حضور آنتی بادی های سرمی ضد ویروس آنفلوانزای مرغی تحت تیپ H9N2 در جمعیت انسانی منطقه اردبیل، مجله پاتوبیولوژی مقایسه ای، ۹(۱): ٦۲۸-٦۱۹.

3- Alexander, D. J. (2007): An Overview of the Epidemiology of Avian Influenza. Vac.25: 5637-5644.

4-Banani, M., Khaki, P., Goodarzi, H., Vand-Yousefi, J., Pourbakhsh, S. A. (2000): Isolation and identification of Ornithobacterium

Archive of SID

www.SID.ir

Pajou. Va. Sazan. 46: 106-109.

5- Banani, M., Momayez, R., Pourbakhsh, S. A., Goodarzi, H.,Bahmani Nejad, M. A. (2002): Simulataneous Isolation of Ornithobacterium Rhinotracheale and Avian Influenza Virus Subtype H9n2 from Commercial Poultry. Iranian. J. Vet. Rea. 3(2):100-115.

6-Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Moazeni-jula, G., Momayez, R.,Ezzi, A. (2003): Natural infection with Ornithobacterium rhinotracheale in commercial poultry and experimental infection in specific- pathogen- free chickens. Pajou. Va. Sazan.55: 28- 37.

7- Bano, S., Naeem, K., Malik, S. A. (2003): Evaluation of Pathogenic Potential of Avian Influenza Virus Serotype H9n2 in Chickens. Avian Dis. 47(3 Suppl): 817-822.

8- Capua, I.,Alexander, D. J. (2004): Avian Influenza: Recent Developments. Avian. Pathol. 33(4): 393 - 404.

9-Chin, R.P., Van empel, P.C.M., Hafez, M.H. (2003) : Ornithobacterium rhinotracheale. in : Disease of poultry,11th edition (Saif,Y.M., Calnek,B.W., Barnes,H., Glisson, J.R ., McDougald, L.R.). Iowa State Press:Ames,;683-688 .

10- Deng, G., Bi, J., Kong, F., Li, X., Qiang, Xu., Dong, J., Zhang, M., Zhao, L., Luan, Z., LV, N., Qiao, J.(2010) : Acute respiratory distress syndrome induced by H9N2 virus. Arch. Virol. 155:187–195

11-Guo, Y. J., Krauss, S., Senne, D. A., Mo, I. P., Lo, K. S., Xiong, X. P. (2000): Characterization of the Pathogenicity of Members of the Newly Established H9n2 Influenza Virus Lineages in Asia. Virol. 267(2): 279-288.

12- 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. Raz. Inst. 58: 51-62.

13- Hafez, M. H. (2002) : Diagnosis of Ornithobacterium rhinotracheale. Inter. J. Poultry Sci. 1: 114-118.

14-Haghighat-Jahromi, M., Asasi, K., Nili, H., Dadras, H.,Shooshtari, A. H. (2008): Coinfection of Avian Influenza Virus (H9n2 rhinotracheale from a broiler and a pullet flock. Subtype) with Infectious Bronchitis Live Vaccine. Arch. Virol. 53(4): 651-655.

15- Kwon, J. S., Lee, H. J., Lee, D. H., Lee, Y. J., Mo, I. P., Nahm, S. S. (2008): Immune Responses and Pathogenesis in Immunocompromised Chickens in Response to Infection with the H9n2 Low Pathogenic Avian Influenza Virus. Virus. Res. 133(2): 187-194.

16- Lee, Y. J., Shin, J. Y., Song, M. S., Lee, Y. M., Choi, J. G., Lee, E. K. (2007): Continuing Evolution of H9 Influenza Viruses in Korean Poultry. Virol. 359(2): 313-323.

17- Liu, J., Okazaki, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Wu, Q., Chen, F. (2003): H9N2 influenza viruses prevalent in poultry in china is phylogenetically distinct from A/quail/ Hong Kong/G1/97 presumed to be the donor of the internal protein genes of the H5N1 Hong Kong/ 97virus. Avian. Pathol.32:552-60.

18-Marien, M., Decostere, A., Duchateau, L., Chiers, K., Froyman, R.,Nauwynck, H. (2007): Efficacy of enrofloxacin, florfenicol and amoxicillin against Ornithobacterium rhinotracheale and Escherichia coli O2:K1 dual infection in turkeys following APV priming. Vet. Microbiol. 121:94–104.

19- Mirzaie, S., Hassanzdeh, M., BozorgmehriFard, M. H., Banani, M. (2011): Isolation and characterization of Ornithobacterium rhinotracheale in the commercial turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods. Arch. Raz. Inst. 66:121-127.

20- 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. . Iranian. J. Vet. Rea. 10(1): 12-20.

21-Naeem, K., Ullah, A., Manvell, R. J., Alexander, D. J. (1999): Avian Influenza a Subtype H9n2 in Poultry in Pakistan. Vet. Rec. 145(19): 560-565.

22-Nili, H,. Asasi, K. (2003): Avian Influenza (H9n2) Outbreak in Iran. Avian. Dis. 47(3 Suppl): 828-831.

Archive of SID

www.SID.ir

23-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.

24- Reed, L. J., Muench, H. (1938): A simple method of estimation of 50% end points. Am. J. Hyg. 27: 493–497.

25-Shamseddini, M., Vasfi Marandi, M., Pourbakhsh, S. A., Gharagozlo, M., Bahmani-Nejad, M., Khazraee-Nia, P. (2002): The Use of Indirect Immunoperoxidase Assay in Diagnosis of Typea (H9n2) Avian Influenza Virus Antigen on Frozen Tissue Sections. Arch. Raz. Inst. 53: 11-21.

26-Swayne, D., Halvorson, D. A.(2008): Infectious influenza. In: Disease of poultry,12th edition ,(Saif, Y.M.,Barres, H.J., Glisson, J.R ., McDougald, L.R., Swayne,D.E.). Iowa State Press:Ames, ;117-165.

27-The World Organisation for Animal Health (OIE). (2008): Avian Influenza, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office. Inter. Des. Epiz. 1: 467–481.

28-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.

29-Toroghi, R., Momayez, R., Pourbakhsh, S. A. (2003): Amino Acid Sequence Analysis of Cleavage Site of Hemagglutinin Protein in Three Avian Influenza Viruses (H9n2). Pajou. Va. Sazan. 60(3): 95-102.

30-Van Empel, P. C. M., Hafez, H. M. (1999): Ornithobacterium rhinotracheale: a review. Avian. Pathol. 28: 217- 227.

31-Vasfi Marandi, M., Bozorgmehrifard, M. H. (1999): An Outbreak of Non-Highly Pathogenic Avian Influenza in Chickens in Iran. 61st meeting of world veterinary association France. P:67-69

32- Vasfi Marandi, M.,Bozorgmehri Fard, M. H. (2002) : Isolation of H9N2 subtybe of avian influenza viruses during outbreak in chickens in Iran. Iran.Bio. J. 6:13-17.

33-Villegas, P. (1998): Titration of Biological Suspensions. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. (Swayne, D. E., Glisson, J. R., Jackwood, M. W., Pearson, J. E., Reed,W. M). American Association of Avian Pathologists, Inc: University of Pennsylvania, ; 248-253.

Archive of SID

www.SID.ir