تأثیر آلودگی ثانویه با ویروس H_9N_2 آنفلوانزا بر گرایش و انتشار بافتی عفونت ناشی از *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* در جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زای خاص

آیدین عزیزپور[1*]، حسین گودرزی[2]، منصور بنانی[2]، مسعود مقدس‌زاده[3]

۱. استادیار، دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل- ایران.
۲. بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج- ایران.
۳. استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز- ایران.

دریافت: ۲۵ اردیبهشت ماه ۹۵ **پذیرش:** ۷ خرداد ماه ۹۶

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر آلودگی ثانویه با سویه H_9N_2 ویروس آنفلوانزا بر گرایش و انتشار بافتی عفونت ناشی از باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (ORT) در اندام‌های مختلف جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زای خاص (SPF) با استفاده از آزمایش‌های کشت، جداسازی و مولکولی بود. بدین‌منظور، شصت قطعه جوجه یک‌روزه SPF نژاد لگهورن به‌صورت تصادفی به سه گروه بیست‌تایی تقسیم و به‌صورت جداگانه در داخل ایزولاتور فشار مثبت در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه رازی کرج نگه‌داری شدند. در سن ۲۱ روزگی، جوجه‌های گروه یک با 1×10^{10} CFU باکتری ORT (JF810491) به روش داخل نایی و سه روز بعد با 1×10^{6} EID_{50} ویروس H_9N_2 (A/Chicken/Iran/ m.1/2010) به روش قطره چشمی و جوجه‌های گروه دو صرفاً با همان باکتری ORT به میزان CFU 1×10^{10} به روش داخل نایی تلقیح گردیدند. جوجه‌های گروه سه نیز به‌عنوان کنترل، فقط PBS دریافت کردند. نمونه‌برداری از اندام‌های مختلف در روزهای ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶پس از آزمایش صورت گرفت. جوجه‌های گروه یک نشانه‌هایی نظیر کزکردگی، ژولیدگی پرها و کم‌اشتهایی نشان دادند، در حالیکه جوجه‌های گروه دو نشانه‌ی بالینی کزکردگی خیلی جزئی داشتند. ویروس H_9N_2 آنفلوانزا در جوجه‌های گروه یک از بافت‌هایی نظیر ریه، نای، بورس فابریسیوس، تیموس، طحال و لوزه‌های سکومی ردیابی شد. باکتریORT فقط در نمونه‌های نای، ریه و کبد پرندگان گروه‌های عفونی جدا گردید. نتایج این پژوهش نشان داد جوجه‌های تلقیح شده با باکتری ORT در صورت ابتلا به آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا، موجب افزایش بیماری‌زایی و همچنین تشدید علایم بالینی و کالبدگشایی ناشی از باکتری ORT می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: باکتریORT، ویروس آنفلوانزا، انتشار بافتی، جوجه های SPF.

مقدمه

بیماری‌های تنفسی طیور به‌دلیل تحمیل تلفات سنگین، هزینه‌های درمانی زیاد و کاهش میزان تولید، اهمیت بسیار زیادی دارند و عوامل عفونی مختلفی در ایجاد این بیماری‌ها دخیل هستند که هر یک از آن‌ها می‌تواند به طور اولیه و همچنین به کمک عوامل عفونی ثانویه و یا عوامل غیرعفونی ضررهای اقتصادی فراوانی به صنعت پرورش طیور وارد کند (۱، ۲، ۷، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۹). *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (ORT) به‌عنوان یکی از عوامل عفونی مطرح در بیماری‌های تنفسی طیور است که در فهرست عفونت‌های باکتریایی قرار دارد (۷ و ۲۰). وقوع عفونت ORT در ایران از سال ۱۳۷۹در بوقلمون، نژادهای مختلف ماکیان شامل مادر گوشتی، جوجه گوشتی، تخمگذار تجاری، مرغ بومی و طیور صنعتی با علایم

---

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: Aidin_azizpour@uma.ac.ir

تنفسی و حتی برخی گونه‌های غیر از ماکیان گزارش شده است و از آن زمان تاکنون اورنیتوباکتریوز تبدیل به یکی از بیماری‌های قابل توجه صنعت طیور کشور گردیده است (۴). مطالعات تجربی صورت گرفته در جوجه‌های SPF نشان داد که برخی از سویه‌های ایرانی و غیرایرانی باکتری ORT می‌توانند به تنهایی و بدون نیاز به حضور سایر عوامل عفونی به‌عنوان پاتوژن اولیه عمل کنند (۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۶ و ۱۹). بر اساس گزارش‌های علمی عوامل عفونی نظیر عفونت‌های هم‌زمان ویروسی و باکتریایی، شرایط آب و هوایی، مسائل سوء مدیریتی و استرس‌های محیطی می‌توانند در تشدید عوارض ORT دخیل باشند (۱، ۲، ۴، ۱۲، ۱۴ و ۱۶).

با این وجود تاکنون مطالعات کاملی در خصوص تأثیر آلودگی ثانویه با سویه H_9N_2 ویروس آنفلوانزا روی عفونت تجربی با ORT، به‌ویژه روند بیماری‌زایی و انتشار بافتی آن‌ها در جوجه‌های SPF صورت نگرفته است؛ بنابراین هدف از این پژوهش بررسی علایم بالینی و ضایعات کالبدگشایی و ویژگی‌هایی بیماری‌زایی و همچنین مشخص کردن گرایش و انتشار بافتی این نوع عفونت است.

مواد و روش کار

در این مطالعه سویه ایرانی باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* با مشخصات ORT-R87-7/1387(JF810491) و جدایه ایرانی ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H_9N_2 با مشخصات (A/chicken/Iran/m.1/2010) از بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور مؤسسه رازی انتخاب گردید و قبل از استفاده با آزمایش PCR تأیید شدند (۲). میزان LD_{50} باکتری پس از کشت در محیط‌های آگار خوندار و BHI و عیار ویروس به‌صورت ۵۰ درصد دز عفونی کننده جنین (EID_{50}) به روش Reed and Muench در سال ۱۹۳۸ محاسبه گردید (۱۵). شصت قطعه جوجه SPF نژاد لگهورن خریداری شده از شرکت ونکی کشور هند (Venkey's, India) در سن یک روزگی به‌صورت تصادفی در سه گروه ۲۰ تایی شامل دو گروه تیمار و یک گروه کنترل توزیع گردید. جوجه‌های هر گروه به طور جداگانه در داخل ایزولاتورهای دارای فشار مثبت (ساخت کشور اسکاتلند Bell Isolation System) در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه رازی کرج در شرایط کنترل شده نگه‌داری شدند.

در سن ۲۱ روزگی به تمامی پرندگان گروه ۱ تیمار میزان ۰/۵ میلی لیتر حاوی 1×10^{10} CFU باکتری ORT به روش داخل نای و سه روز بعد میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع کوریوالانتوئیک عفونی حاوی 1×10^{6} EID_{50} سویه H_9N_2 ویروس آنفلوانزا به روش قطره چشمی تلقیح گردید و جوجه‌های گروه ۲ تیمار فقط با باکتری ORT با همان میزان باکتری و به روش داخل نایی آلوده شدند. در گروه ۳ به‌عنوان کنترل، PBS به روش قطره چشمی جهت تلقیح استفاده شد. جوجه‌ها به مدت ۱۶ روز به‌صورت روزانه به‌منظور بررسی علایم کلینیکی و تلفات تحت نظر قرار گرفتند. سه پرنده از گروه‌های تیمار و دو پرنده از گروه کنترل به‌صورت تصادفی در روزهای ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ پس از چالش اولیه با باکتری انتخاب شدند و از هر پرنده به‌صورت جداگانه خون‌گیری انجام شد؛ سپس پرنده‌ها برای نمونه‌برداری کالبدگشایی شدند. لازم به ذکر است زمان شروع نمونه‌برداری در گروه ۲ تیمار به‌دلیل ردیابی باکتری ORT بدون حضور عوامل ثانویه از روز ۲ پس از تلقیح انجام گرفت. از بافت‌هایی نظیر نای، ریه، کبد، قلب، طحال، کلیه، لوزه‌های سکومی، بورس فابریسیوس و کلوآک برای ردیابی ویروس H_9N_2 به روش‌های جداسازی و مولکولی نمونه‌برداری صورت گرفت. به‌منظور شناسایی باکتری، در شرایط استریل از نای، ریه، کبد و قلب نمونه‌های سوآپ تهیه گردید. از پرندگان مورد مطالعه، قبل (۲۱ روزگی) و بعد از شروع آزمایش (هر دو روز یک بار) به‌منظور بررسی عیار پادتن علیه ویروس

آنفلوانزای چالش شده خون‌گیری به عمل آمد؛ سپس نمونه‌های سرمی آماده شده با تست HI بررسی شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های بافتی اخذ شده با دستگاه هموژنیزاتور بافتی صلایه گردید و سپس با افزودن بافر نمکی فسفاته (PBS) به نسبت ۱۰ درصد به‌صورت سوسپانسیون هموژنیزه در آمد. به‌منظور عاری کردن نمونه‌ها از آلودگی‌های باکتریایی احتمالی آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر پنی‌سیلین (IU/ml ۱۰۰۰۰)، استرپتومایسین (µg/ml ۱۰۰۰۰)، جنتامایسین (µg/ml ۱۰۰۰)، آمفوتریسین B (µg/ml ۵) و تایلوزین (µg/ml ۳۰۰) به محلول اضافه شد. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ، مایع رویی حاصل شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش (ردیابی مولکولی) در فریزر ‎-۷۰°C نگه‌داری شد (۲).

سواب‌های جمع‌آوری شده بر اساس روش‌های استاندارد باکتریولوژیک کشت داده شدند (۴) که شناسایی اولیه آن به کمک شکل‌شناسی پرگنه‌ها و داشتن بویی شبیه به اسید بوتیرک و همچنین اشکال متنوع گرم منفی به همراه دو خصوصیات بیوشیمیایی کاتالاز منفی و اکسیداز مثبت بوده است (۲ و ۵). به‌منظور شناسایی مولکولی باکتری ORT، DNA هر یک از نمونه‌ها به روش فنل- کلروفرم استخراج گردید و از پرایمرهای اختصاصی ORT به نام‌های OR16S-F1 و OR16S-R1 با توالی نوکلئوتیدی طبق جدول ۱ برای تکثیر ژن 16S rRNA استفاده شد (۱۰). مخلوط اصلی PCR و برنامه دمایی آن بر اساس روش Banani و همکاران در سال ۲۰۰۸ آماده گردید (۵). ابتدا مواد PCR از شرکت سیناژن ساخت ایران تهیه شد و واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر (شامل بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر (۱۰x)، $MgCl_2$ ۱/۵ میکرولیتر (۲۵ میلی‌مولار)، DNTP ۰/۵ میکرولیتر(۱۰ میلی‌مولار)، هرکدام از پرایمرها ۱ میکرولیتر(۱۰ پیکومول)، آنزیم Taq پلی‌مراز ۰/۵ میکرولیتر، DNA الگو ۴ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۱۴ میکرولیتر) انجام گرفت. برنامه دمایی مخلوط PCR مطابق با جدول ۲ در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) تنظیم گردید. سرانجام محصول تکثیر شده نهایی به روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد حاوی SYBR safe با استفاده از اشعه UV بررسی شد.

جدول ۱– ردیف‌های بازی و جایگاه پرایمرهای مورد استفاده در ردیابی باکتری ORT

پرایمرها	ژن	توالی	اندازه قطعه تولید شده
OR16S-F1	16S rRNA	5´- GAG AAT TAA TTTACG GAT TAA G-۳´	۷۸۴
OR16S-R1	16S rRNA	5´- TTC GCTTGG TCT CCG AAG AT-۳´	۷۸۴

جدول ۲– برنامه سیکل حرارتی دستگاه ترموسایکلر برای تشخیص ORT

مراحل چرخه	دما	زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴°c	۷ دقیقه	۱
واسرشت ثانویه	۹۴°c	۳۰ ثانیه	۳۰
اتصال آغازگرها به الگو	۵۳°c	۱ دقیقه	
تزاید اولیه	۷۲°c	۲ دقیقه	
تزاید نهایی	۷۲°c	۷ دقیقه	۱

نمونه‌های صلایه و هموژنیزه شده، طبق روش استاندارد جداسازی شدند که فرآیند جداسازی و تشخیص آن به کمک تست‌های هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی ویروس H_9N_2

آنفلوانزا بوده است (۲۱). به منظور ردیابی مولکولی ویروس آنفلوانزا، H_9N_2 هر یک از نمونه‌های اخذ شده بر اساس دستورالعمل کیت تجاری High Pure Viral Nucleic Acid Kit)، ساخت شرکت Roche آلمان) استخراج شد و از پرایمرهای مستقیم (HU_1) و معکوس (HU_2) و توالی نوکلئوتیدی طبق جدول ۳ برای تکثیر ژن H_9 استفاده گردید (۲). واکنش PCR با استفاده از ۴ میکرولیتر از RNA استخراج شده در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۱۰میکرولیتر بافر RT-PCR، ۲/۵ میکرولیتر محلول DTT، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۲ میکرولیتر پرایمر پیش‌بر، ۲ میکرولیتر پرایمر معکوس، ۱/۲۵ میکرولیتر مخلوط آنزیمی، ۴ میکرولیتر RNA الگو، ۲۷/۲۵ میکرولیتر آب مقطر عاری از نوکلئاز انجام گرفت؛ سپس لوله‌ها به دستگاه ترموسایکلر انتقال یافته و تحت برنامه دمایی از قبل تنظیم شده برای انجام واکنش رونوشت‌برداری معکوس (RT) و یا سنتز cDNA قرار گرفتند که به‌منظور انجام مرحله رونویسی معکوس، مخلوط حاصل در دمای ۴۵°C به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد و بعد ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C قرار گرفت؛ سپس واکنش PCR انجام گردید که تعداد چرخه برنامه‌ریزی شده در این مرحله، ۳۴ چرخه در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشت)، ۵۳°C به مدت ۴۵ ثانیه (هم سرشت) و ۶۸ °C به مدت ۶۰ ثانیه (گسترش اولیه) و ۱ چرخه در دمای ۶۸ °C به مدت ۱۰ دقیقه (گسترش نهایی) بود (۲). پس از اتمام مرحله‌ی مذکور، محصول PCR در ژل آگارز یک درصد به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد.

جدول ۳– توالی نوکلئوتیدی و جایگاه پرایمرهای استفاده شده در ردیابی ویروس آنفلوانزا

الیگونوکلئوتید	ژن	توالی	اندازه قطعه تولید شده
Forward (HU_1)	H_9	5´-TATGGGGCATACAYCAYCC-3´	۴۸۶
Reverse (HU_{2c})	H_9	5´- TCTATGAACCCWGCWATTGCTCC -3´	۴۸۶

داده‌های به دست آمده از یافته‌های سرولوژیکی با نرم‌افزار SPSS 13 و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه مقایسه شدند. یافته‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. برای تعیین ارتباط بین روش‌های تشخیصی باکتری از آزمون همبستگی Pearson با بسته نرم‌افزار SPSS 13 و سطح معنی‌دار ۰/۰۱ استفاده گردید.

نتایج

تعداد ۳ قطعه (۱۵ درصد) از جوجه‌های گروه ۱ تیمار، در روز سوم پس از چالش اولیه با باکتری، کزکردگی را نشان دادند. در روز چهارم تعداد مبتلایان به ۵ پرنده (۲۵ درصد) افزایش یافت که همراه با سایر علایمی نظیر کم‌اشتهایی و ژولیدگی پرها بودند. این علایم نیز بعد از چند روز بسیار کم شد، به طوری که از روز هفتم هیچ‌گونه علایم بالینی دیده نشد. در طی آزمایش در جوجه‌های مبتلا تلفاتی مشاهده نگردید و از نظر علایم کالبدگشایی نیز پرخونی ملایم نای همراه با پنومونی در ریه‌ها در روز پنجم پس از تلقیح با باکتری وجود داشت؛ در حالیکه تعداد سه قطعه (۱۵ درصد) از جوجه‌های گروه ۲ تیمار در روزهای سوم تا چهارم پس از تلقیح اولیه با باکتری، فقط دچار کزکردگی بدون هیچ‌گونه علایم کالبدگشایی و تلفاتی شدند که علایم مزبور نیز از روز پنجم مشاهده نگردید. جوجه‌های گروه کنترل در طول مطالعه هیچ‌گونه علایم بالینی، ضایعات کالبدگشایی و تلفاتی نداشتند.

تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده از گروه‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف پس از تلقیح از نظر حضور عوامل بیماری‌زای چالش داده شده بررسی شدند. در

نمونه‌های اخذ شده قبل از تلقیح عوامل عفونی و گروه کنترل، در طول مطالعه هیچ‌گونه باکتری و ویروس ردیابی نگردید. همان‌طور که در جدول ۴ آورده شده است، در گروه ۱ تیمار باکتری ORT در نمونه‌های نای، ریه و کبد به ترتیب در روزهای ۸ و ۱۰ پس از تلقیح، روز ۱۰ پس از تلقیح و روز ۸ پس از تلقیح اولیه با باکتری ردیابی شد؛ در حالیکه در گروه ۲ تیمار باکتریORT در نای در روزهای ۲، ۴ ، ۸، ۱۰ و در ریه و کبد فقط در روز ۴ پس از تلقیح ردیابی شد (جدول ۶). باکتریORT در گروه‌های تیمار در بافت قلب شناسایی نگردید. با توجه به جدول شماره ۵ ویروس H_9N_2 در نای، از روزهای ۶ ، ۸ و ۱۲ پس از تلقیح اولیه با باکتری، در ریه روزهای ۶ و ۸ پس ازتلقیح اولیه با باکتری، در تیموس، طحال و لوزه‌های سکومی فقط در روز ۶ پس از تلقیح اولیه با باکتری ردیابی گردید؛ همچنین تنها نمونه مثبت مربوط به بافت بورس فابریسیوس نیز در روز ۱۲ پس ازتلقیح اولیه با باکتری مشاهده گردید؛ اما ویروس در هیچ‌کدام از نمونه‌های اخذ شده از بافت‌های کبد، کلیه‌ها و کلوآک گروه ۱ و همچنین بافت‌های گروه ۲ تیمار ردیابی نشد. باکتری ORT در روش کشت از بافت‌های نای، ریه و کبد (یک مورد) جدا گردید. در حالیکه در روش PCR علاوه بر بافت‌های مذکور در نای یک مورد دیگر نیز شناسایی شد. سایر نمونه‌های مورد آزمایش در نتایج کشت و PCR کاملاً هم‌خوانی داشتند (جدول ۴). میزان همبستگی بین روش‌های کشت و PCR بسیار معنی‌دار ($P<0/001$) و درصد هم‌خوانی دو روش تشخیصی مورد مطالعه ۹۵/۸۳ بود. ردیابی ویروس در نمونه‌های گروه عفونی در هر دو روش جداسازی و RT-PCR، کاملاً مشابه بود؛ به طوری که تمامی نمونه‌های مثبت روش جداسازی از طریق RT-PCR نیز، مورد تایید قرار گرفتند (جدول ۵).

جدول ۴– نتایج کشت و PCR باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* در گروه ۱ تیمار

نمونه بافتی / روز پس از تلقیح	نای	ریه	کبد	قلب	روش تشخیص
۶	-/-	-/-	-/-	-/-	جداسازی/PCR
۸	+/+	-/-	+/+	-/-	جداسازی/PCR
۱۰	+/-	+/+	-/-	-/-	جداسازی/PCR
۱۲	-/-	-/-	-/-	-/-	جداسازی/PCR
۱۴	-/-	-/-	-/-	-/-	جداسازی/PCR
۱۶	-/-	-/-	-/-	-/-	جداسازی/PCR

+: نمونه‌های مثبت، - نمونه‌های منفی

جدول ۵– نتایج جداسازی و PCR ویروس آنفلوانزا در بافت‌های اخذ شده طی روزهای مختلف در گروه ۱ تیمار

نمونه بافتی / روز پس از تلقیح	نای	تیموس	ریه	کبد	طحال	کلیه‌ها	لوزه‌های سکومی	بورس فابریسیوس	کلوآک	روش تشخیص
۶	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	جداسازی/PCR
۸	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	جداسازی/PCR
۱۰	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	جداسازی/PCR
۱۲	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	جداسازی/PCR
۱۴	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	جداسازی/PCR
۱۶	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	جداسازی/PCR

+: نمونه‌های مثبت، - نمونه‌های منفی

جدول ۶- نتایج کشت و PCR باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* در گروه ۲ تیمار

روز پس از تلقیح / نمونه بافتی	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	روش تشخیص
نای	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	کشت/PCR
ریه	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	کشت/PCR
کبد	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	کشت/PCR
قلب	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	کشت/PCR

+: نمونه‌های مثبت، -: نمونه‌های منفی

نتایج عیار پادتن HI علیه ویروس H_9N_2 آنفلوانزا در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۷ درج شده است. لازم به ذکر است که در روزهای چهارم و ششم پس از آزمایش هیچ‌کدام از گروه‌های مورد مطالعه تیتری علیه ویروس آنفلوانزا نداشتند. در حالیکه از روز هشتم عیار پادتن علیه ویروس H_9N_2 در گروه ۱تیمار نسبت به گروه‌های ۲ تیمار و کنترل به طور معنی‌دار افزایش داشت ($P<0/05$)، اما در گروه‌های ۲ تیمار و کنترل در طول مطالعه هیچ‌گونه پادتنی علیه ویروس آنفلوانزا مشاهده نگردید.

جدول ۷- نتایج میانگین عیار پادتن HI علیه ویروس آنفلوانزا در روزهای مختلف پس از تلقیح در گروه‌های مورد مطالعه

روز پس از تلقیح / گروه‌ها	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶
تیمار ۱	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۲/۶±۰/۵۳^{b}	۶/۰±۰/۴۲^{b}	۷/۰±۰/۱۰^{b}	۶/۶±۰/۹۵^{b}	۶/۳±۰/۸۲^{b}
تیمار ۲	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}
کنترل	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}	۰±۰/۰۰^{a}

a ,b در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بحث

بیماری تنفسی ناشی از *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* عفونتی باکتریایی در ماکیان و بوقلمون است که طی سال‌های اخیر از نقاط مختلف جهان گزارش شده است (۷ و ۱۶). در ایران نیز حضور باکتری برای اولین بار در سال ۱۳۷۹ گزارش شد (۴). طبق پژوهش‌های تجربی، برخی از سویه‌های باکتری ORT به تنهایی قادر به ایجاد علایم کلینیکی در جوجه‌های SPF هستند (۱۴، ۱۸ و ۱۹) و در حضور عوامل مستعدکننده نظیر ضعف مدیریتی، تراکم بالا و تهویه ناکافی و یا در صورت بروز عفونت‌های باکتریایی و ویروسی تنفسی، بیماری‌زایی ORT تشدید می یابد (۲، ۸، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۶). یکی از این عوامل ثانویه مهم ویروس آنفلوانزا است که در کمپلکس‌های تنفسی طیور با تلفات زیاد و به‌صورت عفونت هم‌زمان گزارش شده است (۴). با این حال تاکنون مطالعات کاملی بر روی عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا متعاقب بیماری ORT در جوجه‌هایSPF انجام نگرفته است، تا نقش ویروس H_9N_2 آنفلوانزا به‌عنوان تشدید کننده حدت ORT دقیقا مشخص شود. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی روند بیماری‌زایی و انتشار بافتی، علایم بالینی و ضایعات کالبدگشایی عفونت اولیه با باکتری ORT و آلودگی ثانویه با ویروس H_9N_2 در جوجه‌های SPF بوده است و جهت ردیابی و تشخیص دقیق عوامل بیماریزا در اندام‌های مورد بررسی از روش‌های مختلف تشخیصی به‌صورت توام استفاده گردید

(۲، ۳، ۵، ۹ و ۱۴).

طبق پژوهش‌های صورت گرفته باکتری ORT به تنهایی در جوجه‌های SPF نسبت به جوجه‌های گوشتی تجاری بیماری‌زایی کمی دارد (۱۳، ۱۶ و ۱۹). به طوری که در یک تحقیق انجام شده در مرغان تخم‌گذار SPF نژاد لگهورن ۸ هفته آلوده به عفونت ORT هیچ‌گونه علایم بالینی و کالبدگشایی و تلفاتی مشاهده نگردید (۱۶). در مطالعات تجربی صورت گرفته در جوجه‌های SPF نژاد لگهورن ۲ و ۳ هفته مبتلا به ORT به‌ترتیب فقط علایم جزئی کالبدگشایی (در کیسه‌های هوایی و ریه) و صرفاً علایم خفیف بالینی بدون مرگ و میر مشاهده شد (۱۷ و ۱۹). در عفونت تجربی دیگر در جوجه‌های SPF تلقیح شده با باکتریORT، ۳۰ درصد از پرندگان عفونی فقط علایم بالینی جزئی نشان دادند (۱۳). در حالیکه در جوجه‌های گوشتی تجاری ۳ هفته درگیر با ORT، این عفونت منجر به بروز تلفات تا ۵۰ درصد و ظهور علایم شدید بالینی و کالبدگشایی در جوجه‌های عفونی گردید (۱۴). مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف در شرایط تجربی در جوجه‌های SPF و گوشتی تجاری نشان داد که عفونت ORT در صورت ظهور شرایط مستعدکننده نظیر ابتلا به بیماری‌های ویروسی و باکتریایی به‌صورت عفونت همزمان یا آلودگی ثانویه، سبب تشدید علایم بالینی و کالبدگشایی و تلفات در جوجه‌های عفونی می‌گردد (۲، ۴، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۶). به طوری که در جوجه‌های گوشتی ۳ هفته مبتلا به ORT، در اثر عفونت همزمان با ویروس H_9N_2 آنفلوانزا میزان تلفات تا ۲۰ درصد و تحت آلودگی ثانویه با همان ویروس آنفلوانزا تا ۳۰ درصد افزایش یافت و همچنین شدت علایم بالینی و کالبدگشایی گروه‌های همزمان و آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا در مقایسه با گروه ORT انفرادی به طور معنی‌داری بیشتر بود (۱۴). در یک عفونت تجربی همزمان باکتری‌های *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* و *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در جوجه‌های SPF علایم بالینی در مقایسه با گروه‌های عفونی انفرادی شدید گزارش گردید (۱۳). در یک مطالعه نیز در جوجه‌هایSPF ۳ هفته آلوده به عفونت همزمان ویروس H_9N_2 آنفلوانزا و باکتری ORT، علایم بالینی و کالبدگشایی (افسردگی، کم‌اشتهایی، ژولیدگی پرها، اسهال، علایم شدید تنفسی، پرخونی نای و ریه، تورم کلیه و تورم کیسه های هوایی) به مراتب خیلی شدیدتر از گروه‌های آنفلوانزا و ORT انفرادی بود که منجر به ایجاد تلفات به میزان ۱۵ درصد در جوجه‌های عفونی گردید (۲)؛ همچنین یک پژوهش تجربی دیگر نیز نشان داد که عفونت همزمان ویروس برونشیت عفونی و باکتری اشریشیاکلای و تحت آلودگی ثانویه با باکتری ORT در مرغان SPF نژاد لگهورن ۸ هفته نه تنها موجب تشدید علایم بالینی و کالبدگشایی ناشی از گروه همزمان ویروس برونشیت عفونی و باکتری اشریشیاکلی (E.coli+IBV) شد، بلکه موجب افزایش میزان تلفات تا ۵ درصد نسبت به گروه همزمان E.coli+IBV نیز گردید (۱۶).

در پژوهش حاضر، در جوجه‌های SPF تلقیح شده فقط با باکتری ORT فقط کزکردگی مشاهده گردید. در حالیکه در جوجه‌های گروه آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا متعاقب تلقیح ORT علایم بالینی نظیر کزکردگی، کم‌اشتهایی، ژولیدگی پرها، پرخونی ملایم نای و پنومونی وجود داشت که این یافته‌ها نشان دهنده‌ی تشدید علایم بالینی ORT در اثر عفونت ثانویه با ویروس H_9N_2 آنفلوانزا است و با گزارش‌های مطالعات پژوهشگران همسو هست (۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۶). اما از نظر فقدان تلفات با نتایج Azizpour و همکاران در سال ۲۰۱۴، Pan و همکاران در سال ۲۰۱۲ و Thachil و همکاران در سال ۲۰۰۹ همخوانی ندارد (۲، ۱۴ و ۱۶). به نظر می‌رسد این مغایرت به فاکتورهایی نظیر مدیریت و شرایط تغذیه‌ای، بیماری‌زایی سویه‌های ویروس و باکتری و روش تلقیح آنها، نوع ایجاد آلودگی (تقدم و یا تأخر بودن عفونت‌ها نسبت به هم و یا همزمانی)، عوامل تضعیف‌کننده ایمنی، یا نوع نژاد، سویه و سن پرندگان مرتبط باشد.

پژوهش‌های تجربی مختلف نشان داد که باکتری ORT در اندام‌هایی نظیر نای، ریه، سینوس‌های تحت حدقه‌ای، کبد، کلیه‌ها، کیسه‌های هوایی، مفاصل، مغز، تخمدان‌ها و مجرای تخم در جوجه‌های عفونی قابل تشخیص است (۹، ۱۰، ۱۷ و ۲۰). طبق پژوهش‌های Van Empel و همکاران در سال ۱۹۹۶ باکتری در اندام‌های تنفسی به‌ویژه نای جوجه‌های مبتلا به عفونت ORT به مدت طولانی تکثیر می‌یابد که این عامل سبب مستعد شدن پرنده جهت ابتلا به سایر بیماری‌ها می‌گردد (۱۸). در عفونت همزمان ویروس برونشیت عفونی و باکتری اشریشیاکلای که تحت آلودگی ثانویه با ORT قرار گرفته بودند، باکتری در کیسه‌های هوایی و نای تا دو هفته و سینوس‌های تحت حدقه‌ای تا ۴ هفته بعد ردیابی گردید (۱۶).

در پژوهش حاضر در گروه ۱ تیمار باکتریORT، در نای و ریه در روز ۱۰ پس از تلقیح اولیه با باکتری و در کبد در روز ۸ پس از تلقیح اولیه با باکتری ردیابی شد که این نتایج با یافته‌ها پژوهشگران در مورد تکثیر ORT در اندام‌های تنفسی و کبد همسو هست (۹، ۱۰، ۱۷، ۱۸ و ۲۰). اما از نظر عدم ردیابی زودتر و طولانی‌تر باکتری در ارگان‌های تنفسی با یافته‌های برخی پژوهشگران (۲ و ۱۶) همخوانی ندارد. این مغایرت به عواملی نظیر زمان نمونه‌برداری و نوع آلودگی (تکی، یا تقدم و یا تأخر بودن عفونت‌ها نسبت به هم) مربوط می‌باشد. به طوری که در پژوهش حاضر در گروه ۲ تیمار (ORT انفرادی) برای ردیابی حضور باکتری بدون دخالت عوامل ثانویه عفونی، نمونه‌برداری از روز دوم بعد از تلقیح باکتری آغاز گردید که حضور باکتری در نای و ریه در روز ۴ بعد از عفونت جدا شد. اما در گروه آلودگی ثانویه با ویروس H_9N_2 اولین روز نمونه‌برداری شش روز بعد از تلقیح باکتری ORT (سه روز بعد از تلقیح ویروس H_9N_2) بود. لیکن عدم ردیابی باکتری در روزهای کمتر از ۶ پس از عفونت به همین دلیل قابل توجیه است. احتمالاً به نظر می‌رسد تکثیر و انتشار عمده ویروس H_9N_2 در اندام‌های تنفسی سبب کاهش تکثیر ORT شده است که نهایتا منجر به عدم ردیابی آن در روزهای ۶ و ۸ بعد از عفونت در ریه گردیده است. اگرچه حضور باکتری در قلب جوجه‌های عفونی قبلاً گزارش شده است (۲، ۱۶ و ۱۸)، اما در این بررسی از قلب جوجه‌ها شناسایی نگردید. به نظر می‌رسد نوع آلودگی (همزمانی عفونت) با سایر عوامل بیماری‌زا روی تکثیر باکتری در ارگان‌های داخلی تأثیر دارد.

Hablolvarid و همکاران در سال ۲۰۰۴ نوکلئوپروتئین ویروس H_9N_2 آنفلوانزا را با روش ایمنوهیستوپاتولوژیکی، در نای، ریه‌ها و لوزه‌های سکومی جوجه‌های SPF با سن ۵ هفتگی شناسایی کردند (۱۱). Bano و همکاران در سال ۲۰۰۳، نیز در عفونت اولیه با جدایه پاکستانی ویروس H_9N_2 آنفلوانزا و آلودگی ثانویه با ویروس برونشیت عفونی و باکتری‌های *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* و اشریشیاکلی نشان دادند که آنتی‌ژن ویروس در بافت‌های نای، ریه، کلیه ها و بورس فابریسیوس قابل جدا کردن است (۶). در یک پژوهش تجربی دیگر به‌صورت عفونت همزمان جدایه ایرانی ویروس H_9N_2 آنفلوانزا با باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* در جوجه‌های SPF، ویروس در نای، ریه، بورس فابریسیوس، کبد، تیموس و کلیه‌ها ردیابی شد (۲).

در پژوهش حاضر نیز ویروس H_9N_2 آنفلوانزا در ریه، نای، بورس فابریسیوس، تیموس، طحال و لوزه‌های سکومی شناسایی گردید که نتایج حاضر با یافته‌های مطالعات پیشین همسو است (۶ و ۱۱). اما از نظر عدم‌ردیابی ویروس H_9N_2 در اندام‌هایی نظیر کبد و کلیه‌ها با نتایج Azizpour و همکاران در سال ۲۰۱۴ که به‌صورت همزمان جوجه‌های SPF را به ویروس H_9N_2 و باکتری ORT عفونی کرده بودند، همخوانی ندارد (۲). به نظر می‌رسد این مغایرت مربوط است به زمان تلقیح ویروس و نوع آلودگی (همزمانی یا تقدم و یا تأخر بودن عفونت‌ها نسبت به هم) که روی تکثیر و انتشار ویروس در

اندام‌های داخلی تأثیر دارد.

با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر این سویه‌ی *باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* به‌عنوان عامل اولیه، فقط قادر به ایجاد بیماری خیلی خفیف بالینی در جوجه‌های SPF است. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد جوجه‌های عفونی شده با همان سویه ORT در صورت ابتلا به آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا سبب تشدید علایم بالینی و کالبدگشایی بیماری ناشی از ORT می‌گردد. به‌دلیل اهمیت عفونت‌های ثانویه پیشنهاد می‌شود نقش سایر عوامل بیماری‌زا نظیر نیوکاسل، برونشیت عفونی، گامبورو، متانوموویروس، اشریشیاکلای، هموفیلوس *پاراگالیناروم*، پاستورلا، استافیلوکوک و مایکوپلاسما در عوارض حاصل از عفونت ORT در نژادها و سویه‌های مختلف پرندگان تجاری مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱- گودرزی، حسین؛ عزیزپور، آیدین؛ چرخکار، سعید؛ حبل الورید، محمد حسن و ممیز، رضا؛ مطالعه آسیب‌شناسی بافتی عفونت تجربی با *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* متعاقب تلقیح تحت تیپ H_9N_2 ویروس آنفلوانزا؛ مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای؛ ۱۳۹۴؛ ۱۲(۴): ۱۷۸۳-۱۷۹۲.

2- Azizpour, A; Goudarzi, H; Charkhkar, S; Momayez, R. and Hablolvarid, M.H; Experimental study on tissue tropism and dissemination of H_9N_2 avian influenza virus and *Ornithobacterium rhinotracheale* co-infection in SPF chickens. J Anim and Plan Sci; 2014; 24(6): 1655-1662.

3- Azizpour, A. and Azizpour, Y; Comparing Culture and PCR for detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection. Iranian. J Public Healt; 2014; 43(Supple 2): 292.

4- Banani, M; Momayez, R; Pourbakhsh, S.A; Goodarzi, H. and Bahmani Nejad, M.A; Simulataneous Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* and Avian Influenza Virus Subtype H_9N_2 from Commercial Poultry. Iranian. J Vet Res; 2002; 3: 100-115.

5- Banani, M; Pourbakhsh, S.A; Erami, M; Gholamin, F. and Fatehmanesh, M; Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* using polymerase chain reaction (PCR). Iranian. J Vet Res; 2008; 6 (1): 41-45.

6- Bano, S; Naeem, K. and Malik, S.A; Evaluation of Pathogenic Potential of Avian Influenza Virus Serotype H_9N_2 in Chickens. Avian Dis; 2003; 47(3 Suppl): 817-822.

7- Chin, R.P; Van empel, C.P. and Hafez, M.H; *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection. In: Disease of poultry, 13th Edition, (Swayne, D.E; Glisson, J.R; McDougald, L.R; Nolan, L,K; Suarez, D.L; Nair, V.L), Iowa State Press: Ames; 2013; 828-839.

8- Franz, G; Hein, R; Bricker, J; Walls, P; Odor, E; Salem, M. and Sample, B; Experimental studies in broilers with a Delmarva *Ornithobacterium rhinotrachealeisolate*. 46th Western Poulty Diseases Conference, Sacramento; 1997; 46-48.

9- Hafez, H.M. and Beyer, W; Preliminary investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) isolates using PCR Fingerprints. IX th World Veterinary Poultry Association Congress, Hungary; 1997; 51-52.

10- Hafez, M. H; Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Inter. J Poult Sci; 2002; 1: 114-118.

11- Hablolvarid, M.H; Sohraby Haghdost, I; Pourbakhsh, S.A. and Gholami, M.R; Histopathological Study of Intranasally Inoculated a/Chicken/Iran/259/1998(H_9N_2) Influenza Virus in Chicken. Arch Raz Inst; 2004; 58: 51-62.

12- Marien, M; Decostere, A; Martel, A; Chiers, K; Froyman, R. and Nauwynck, H; Synergy between avian pneumovirus and Ornithobacterium rhinotracheale in turkeys. Avian Pathol; 2005; 34: 204-11.

13- Morales-Erasto, V; Falconi-Agapito, F; Luna-Galaz, G.A; Saravia, L.E; Montalvan-Avalos, A.E; Soriano-Vargas, E. and Fernández-Díaz, M; Coinfection of Avibacterium paragallinarum and Ornithobacterium rhinotracheale in Chickens from Peru. Avian Dis; 2016; 60: 75-78.

14- Pan, Q; Liu, A; Zhang, F; Ling, Y; Ou, C; Hou, N. and He, C; Co-infection of broilers with *Ornithobacterium rhinotracheale* and H_9N_2 avian influenza virus. BMC. Vet. Res; 2012; 8: 104. doi:10.1186/1746-6148-8-104.

15- Reed, L.J. and Muench, H; A simple method of estimation of 50% end points. American. J hyg; 1938; 27: 493-497.

16- Thachil, A.J; Velayudhan, B.T; Shaw, D.P; Halvorson, D.A; Nagaraja, K.V; Pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* in egg-laying hens with coexisting infectious bronchitis virus and Escherichia coli infections. J Appl Poult Res; 2009; 18:780-788.

17- Van Beek, P.N.G.M; Van Empel, P.C; Van den Bosch, G; Stonn, P.K; Bongers, J.H. and Du Preez, J.H; Respiratory problems, growth retardation and arthritis in turkeys and broilers caused by a Pasteurella-like organism: *Ornithobacterium* *rhinotracheale* or ‘Taxon 28. Tijd Dierge; 1994; 119: 99-101.

18- Van Empel, P; Van den Bosch, H; Goovaerts, D. and Storm, P; Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. Avian Dis; 1996; 40: 858-864.

19- VanVeen, L; Van Empel, C. P. and Fabria, T; *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in broilers. Avian Dis; 2000; 44: 896-900.

20- Vandamme, P; Segers, P; Vancanneyt, M; Van Hove, K; Mutters, R. and Hommez, J; *Ornithobacterium rhinotracheale* Gen. Nov., Sp. Nov., Isolated from the Avian Respiratory Tract. Inter. J Syst Bact; 1994; 44(1): 24-37.

21- Vasfi Marandi, M. and Bozorgmehri Fard, M.H; Isolation of H_9N_2 subtybe of avian influenza viruses during outbreak in chickens in Iran. Iranian Biomed J; 2002; 6: 13-17.

Effect of secondary infection with H_9N_2 avian influenza virus on tissue tropism and dissemination of *Ornithobacterium rhinotracheale* in SPF chickens

Azizpour, A. [1*]; **Goudarzi, H.**[2]; **Banani, M.**[2]; **Moghaddaszadeh, M.**[3]

1. Assistant Professor, Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of mohaghegh Ardabili, Ardabil- Iran.
2. Department of Avian Diseases Research and Diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj- Iran.
3. Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz- Iran.

Recieved: 15 May 2016 ***Accepted:*** 28 May 2017

Summary

The purpose of this study was to investigate effect of secondary infection with avain influenza virus subtype H_9N_2 on tissue tropism and dissemination of *ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) bacteria and H_9N_2 AI virus in different organs of specific pathogen free (SPF) chickens. Sixty, one-day-old SPF chicks ‘were randomly divided into three groups. They were kept in separate positive pressure isolators. On 21st day of study, the chicks in group 1 was inoculated intratracheally with 1×10^{10} CFU of ORT and three days later were adminstrated intraocularly with 1×10^{6} EID_{50} of the H_9N_2, group 2 only inoculated with ORT bacteria. Group 3 as control was inoculated with PBS’ intraocularly. The samples from various tissues were collected at 6, 8, 10, 12, 14 and 16 days post-inoculation (DPI). In group 1 chickens exhibited ruffled feathers, depression and reduced appetite, while in group 2 had minor clinical signs depression. The H_9N_2 AI virus was detected from lungs, trachea, bursa of fabricius, thymus, spleen and cecal tonsils of first group birds. The ORT was detected in the trachea, lung and liver of infected groups. The results showed that infected chickens with ORT under secondary infection by H_9N_2 AI virus cause exacerbate virulence and clinical signs and lesions of ORT.

Keywords: ORT, H_9N_2 AI virus, Tissue dissemination, SPF chickens.

---

* Corresponding Author E-mail: Aidin_azizpour@uma.ac.ir