

مطالعه تجربی عفونت همزمان ویروس آنفلوانزای H9N2 و باکتری

اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال در جوجه‌های SPF

آیدین عزیزپور^{۱*}، حسین گودرزی^۲، سعید چرخکار^۳، رضا ممیز^۲، محمدحسن حبل‌الورید^۴

چکیده

مقدمه

آنفلوانزای طیور بیماری ویروسی از خانواده اورتومیکسویریده است که تنها تیپ A آن در پرندگان ایجاد عفونت طبیعی می‌نماید (۲۶ و ۲، ۱). تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزای نوع A بر اساس دو گلیکو پروتئین هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) تعیین می‌شود که تاکنون ۱۶ نوع HA و ۹ نوع NA شناسایی شده است (۲۶ و ۲). دامنه وسیعی از حدت در ویروس‌های آنفلوانزا پرندگان وجود دارد که از یک عفونت بدون علائم بالینی تا ظهور صددرصد تلفات در پرندگان حساس متغیر می‌باشد (۳۲ و ۳۰، ۲۶). 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). در طی 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 (۳۲ و ۲۷، ۲۶، 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 (۲۶). بطوریکه تشدید بیماری‌زایی تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای A جدا شده از جوجه‌های بیمار توسط

در این مطالعه بیماری‌زایی عفونت همزمان ویروس H9N2 (A/chicken/Iran/m/1/2010) و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT- R87-7/1387) و تمایل این عفونت به بافت‌های مختلف و همچنین انتشار آن در بدن جوجه‌های نژاد لگهورن SPF مورد بررسی قرار گرفت. همچنین علائم بالینی و ضایعات کالبدگشایی در پرندگان مبتلا ارزیابی شد. چهل قطعه جوجه تفریح 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 جوجه‌های گروه آزمایش، همزمان به روش قطره چشمی به ویروس H9N2 با عیار 10^6 EID50 و باکتری ORT به روش داخل نای به مقدار 1×10^{11} CFU آلوده شدند. نمونه‌گیری از بافت‌های مختلف در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ بعد از آلوده‌سازی انجام شد. در این مطالعه به منظور بررسی روند انتشار ویروس از روش جداسازی ویروس از طریق تلقیح به تخم مرغ‌های SPF جنین‌دار ۱۱ روزه و کشت باکتریایی از سوآب‌های اخذ شده بر روی محیط کشت آگار خوندار استفاده گردید. جوجه‌های گروه آزمایش افسردگی، کم اشتها، ژولیدگی پرها، علائم شدید تنفسی و ۱۵ درصد تلفات نشان دادند. بیشترین علائم بالینی در روز ۳ بعد از تلقیح مشاهده گردید. باکتری ORT از سوآب نای در روزهای ۲ و ۴ پس از تلقیح و از ریه در روز ۴ 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 ۴ بعد از تلقیح در ریه و نای جداسازی گردید. همچنین ویروس در روزهای ۲ و ۶ بعد از جالش در بورس فابریسیوس ردیابی شد. ویروس تنها در روز ۲ پس از تلقیح در نمونه‌های تیموس و کبد و روز ۸ پس از تلقیح در کلیه‌های پرندگان مبتلا جداسازی شد. درحالی‌که در طی کل دوره مطالعه، ویروس در طحال، لوزه‌های اسکومی و کلوآک یافت نشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری و ویروس به ترتیب از روزهای ۶ و ۱۰ 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 کالبدگشایی در جوجه‌های دچار عفونت شد.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزای H9N2، اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال، عفونت

همزمان، تمایل بافتی، جوجه‌های SPF

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۴

*دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشجوی دکتری تخصصی بیماری‌های طیور، تهران، ایران.

aidin_azizpour@yahoo.com

۲-استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، حصارک کرج،

ایران.

۳-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه بیماری‌های طیور، تهران، ایران.

۴-استادیار بخش باتولوژی، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، حصارک کرج، ایران.

عفونت باکتریائی بود و این جنین‌ها حذف گردیدند. اما ۲ تا ۷ روز بعد از تلقیح اختصاصی ویروس، تخم مرغ‌هایی که جنین‌هایی آنها مرده بود به یخچال 4°C منتقل و مایع‌های آلتوتوئیک آنها در شرایط استریل برداشت شد و در درجه حرارت کمتر از -40°C درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. در پایان روز ۷ پس از تلقیح، مایع آلتوتوئیک 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 - کاربرد محاسبه شد (۳۳).

باکتری ORT

جدایه ایرانی باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال با مشخصات (JF810491)ORT-R87-7/1387 در بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های باکتریایی طیور موسسه رازی انتخاب و استفاده شد. این جدایه بوسیله آزمایش‌های PCR و ERIC-PCR مورد شناسایی قرار گرفته است و میزان باکتری به صورت 1×10^8 CFU به روش Reed and Muench (۱۹۳۸) محاسبه شد (۲۴).

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 ۱ و ۲).



نگاره ۱- دستگاه ایزولاتور (Bell Isolation System) استفاده شده در

مطالعه حاضر

عفونت همزمان با ویروس واکسن زنده برونشیت عفونی و باکتریایی نظیر استافیلوکوک طلایی و هموفیلوس پاراگالیناروم به اثبات رسیده است (۱۶ و 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 این رو 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 آنفلونزای طیور تحت تیپ H9N2 (A/chicken/Iran/m.1/2010) مورد استفاده قرار گرفت. عیار ویروس با تلقیح 0.2 میلی‌لیتر از رقت‌های متوالی بر مبنای یک دهم (10^{-1} - 10^{-9}) بذر ویروسی در PBS در داخل فضای کورویوالانتوتوئیک تخم مرغ‌های جنین‌دار ۱۱ روزه SPF محاسبه گردید. بطوریکه هر رقت مورد نظر در ۳ تخم مرغ در زیر هود کلاس II تلقیح و بعد از انتقال به انکوباتور 37°C 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 ۲۴ ساعت اول حاصل

و سپس با افزودن بافر نمکی فسفات‌ه (PBS) به نسبت ۱۰ درصد به صورت سوسانسیون هموژنیزه در آمد.

کشت و جداسازی ORT

نمونه سواب های جمع آوری شده در هر نوبت بلافاصله بر روی محیط کشت آگار خوندار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، جنتامایسن و پلی میکسین B (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 ۴۸ 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 و کاتالاز مورد شناسایی و تشخیص قرار می گرفتند. (نگاره ۳) (۱۳، ۹، ۴).



نگاره ۳- رشد کلونی های باکتری ORT در مدت ۴۸ ساعت در محیط آگار خوندار، داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد.

جداسازی H9N2

از نمونه های صلایه و هموژنیزه شده به میزان ۰/۲ میلی لیتر در داخل فضای کوریوالانتوئیک تخم مرغ های جنین دار ۱۱ روزه SPF 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



نگاره ۲- 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 ۱۰^۶ در ۰/۱ سی سی از مایع کوریوالانتوئیک عفونی حاوی ویروس H9N2 به روش قطره چشمی و ۱۰^{۱۰}×۱ سی سی حاوی باکتری ORT به روش داخل نای تلقیح شدند. گروه دوم نیز بعنوان گروه کنترل انتخاب و صرفاً مایع آلتوئیک 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، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ پس از تلقیح، سه جوجه از هر گروه بصورت تصادفی انتخاب گردید و بعد از کالبدگشایی سواب و نمونه برداری 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 کلواک حاوی مدفوع جهت شناسایی ویروس H9N2 با استفاده از روش جدا سازی اخذ گردید و همچنین در حین نمونه برداری از بافتهای مختلف سواب‌های نای، ریه قلب و کبد جهت ردیابی باکتری ORT جمع آوری شد. لازم بذکر است که نمونه‌های بافتی با دستگاه آسیاب کننده بافت جهت انجام عملیات جداسازی ویروس صلایه گردید

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 علائم بالینی، ضایعات کالبدگشایی و تلفات مشاهده نگردید (نگاره‌های ۴ و ۵).



نگاره ۴- پرخونی شدید نای در جوجه تلف شده گروه عفونی در ۲ روز پس از تلقیح



نگاره ۵- 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

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 آلتوئیک که از نظر آنفلوانزا منفی شدند، جهت اطمینان از منفی بودن آنها مجدداً در پاساژ دوم به تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شدند (۳۲ و ۲۳).

نتایج

علائم بالینی و کالبدگشایی

تعدادی از جوجه‌های مربوط به گروه آلوده شده از روز دو پس از تلقیح دچار کم اشتها، زولیدگی 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 علائم بالینی در روز ۳ بعد از تلقیح مشاهده گردید، اما علائم از روز ششم پس از تلقیح بسیار کم شد. بطوریکه علائم ملایم تنفسی و کزکردگی داشتند و از روز دوازدهم پس از تلقیح هیچ گونه علائم 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 جوجه‌ها علائم 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 کلیه‌ها، 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

نمونه‌های مربوط به تیموس و کبد 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 نمونه‌های سوآب پس از تلقیح

همزمان H9N2 و ORT

روز پس از تلقیح	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴
نای	+	+	-	-	-	-	-
ریه	-	+	-	-	-	-	-
قلب	-	-	-	-	-	-	-
کبد	-	-	-	-	-	-	-

*: + نمونه‌های مثبت، - نمونه‌های منفی

سوآب نای در روزهای ۲ و ۴ پس از تلقیح و در ریه ۴ روز پس از تلقیح جداسازی گردید. اما باکتری در سوآبهای کبد و قلب در طی کل دوره مطالعه جداسازی نشد. ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 در تمامی نمونه‌های اخذ شده از گروه عفونی شده به استثناء بافت طحال، لوزه‌های سکومی و کلواک 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 ۴ پس از تلقیح جداسازی گردید. در بورس فابریسیوس از روزهای ۲ و ۶ پس از تلقیح و در

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	کلواک
۲	+	+	+	+	-	-	-	+	-
۴	+	-	+	-	-	-	-	-	-
۶	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۸	-	-	-	-	-	+	-	-	-
۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۲	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱۴	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: + 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 باکتریایی از قبیل ویروس‌های نیوکاسل (به استثنای سویه‌های Velogenic)، آنفلوآنزای طیور، برونشیت عفونی، پنوموویروس‌ها و باکتری‌های E.coli، ORT و مایکوپلاسماها می‌توانند در ایجاد این سندرم نقش داشته باشند. تحت تیپ H9N2 ویروس

آنفلوآنزای پرندگان در گروه با بیماریزایی پائین (LPAI) طبقه بندی می‌گردد (۲۶) که اولین رخداد این ویروس در ایران مربوط به سال ۱۳۷۷ می‌باشد که توسط وصفی مرندی و بزرگمهری فرد 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

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 و لاغری 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 متشره در مجرای تنفسی (نای و ریه ها)، تورم کسپه های هوایی، پریکاردیت و پنومونی جوجه های آلوده شده به عفونت همزمان H9N2 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 می شود، بلکه موجب افزایش میزان تلفات و طولانی شدن دوره دفع ویروس آنفلوانزا نیز در جوجه های گوشتی می گردد (۱۴). در مطالعه حاضر نشانی بالینی کزکردگی، ژولیدگی پرها، مشکل شدید تنفسی و کاهش وزن گیری و علایم کالبدگشایی، التهاب و پرخونی نای، تورم و چرکی شدن کسپه های هوایی و پنومونی در مقایسه با گروه شاهد بود که با نتایج حاصل از مطالعات پژوهشگران همسو می باشد (۲۸ و ۱۸، ۱۴).

مصلح و همکاران (۲۰۰۹) با تلقیح داخل بینی تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا مشخص کردند که می توان ریبونوکلیتیک اسید (RNA) ویروس را از نای، ریه ها و طحال در طی روزهای ۳ و ۶ پس از تلقیح، کلیه ها در روزهای ۳، ۶ و ۹ پس از تلقیح و مدفوع فقط در روز ۶ پس از تلقیح جدا نمود، ولی این محققین نتوانستند ویروس را از خون و پانکراس جداسازی نمایند، همچنین مشخص شد که در روز ۶ پس از تلقیح، تعداد پرندگان دچار عفونت و اندام های 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 تیترا آنتی بادی و بهبودی ماکیان بود (۲۰).

این چند سال اخیر به صورت اپیدمی شدید با تلفات زیاد به ویژه در نیمچه های گوشتی در اکثر مرغداری های صنعتی کشور همانند کشورهای آسیایی و خاورمیانه (۲۱ و ۱۱، ۱۰، ۷) گزارش گردیده است. علت تلفات بالای ناشی از این ویروس دقیقاً مشخص نیست زیرا بر اساس مطالعات مختلف، ویروس آنفلوانزا به تنهایی موجب عوارض مهمی در گله طیور نمی شود (۲۹ و ۲۶). اما بر اساس گزارش های علمی، عوامل مختلفی از قبیل مشکلات مدیریتی، استرس های محیطی و عفونت های همزمان باکتریایی و ویروسی در تشدید عوارض و تلفات دخیل هستند (۱۷ و ۱۴). یکی از این عوامل باکتریایی در کمپلکس تنفسی صنعت طیور، باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال می باشد که اولین بار در ایران توسط بنانی و همکاران در سال ۱۳۷۹ از یک گله جوجه گوشتی و گله پالت تخم گذار که علایم تنفسی داشتند در موسسه رازی کرج جداسازی و شناسایی شد (۴). متعاقباً این باکتری از بوقلمون و سایر نژاد های ماکیان توسط این محققین نیز گزارش گردید (۹ و ۶). 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 (۲۸ و ۱۸، ۱۰، ۶). همچنین آلودگی همزمان ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 و باکتری ORT از ۲۶ 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 روش های مختلفی بررسی گردیده است (۲۵ و ۲۰، ۱۶، 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.

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 آنفلوآنزای با بیماریزایی پائین از کلیه‌ها و طحال طیور تخمگذار تجاری در سن ۳۵ هفتگی شناسایی و جداسازی شده است (۱۶). شمس‌الدینی و همکاران (۲۰۰۲) آنتی‌ژن ویروسی H9N2 را با استفاده از آزمایش ایمنوپراکسیداز در نای، ریه‌ها، و کلیه‌های جوجه‌های گوشتی نژاد آرین در سن ۶ هفتگی شناسایی نمود (۲۶). در مطالعه ایمنوهیستوپاتولوژیکی حبل‌الورید و همکاران (۲۰۰۴) 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 ۴ پس از تلقیح در ریه و نای، روزهای ۲ و ۶ 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 (۲۵ و ۲۰، ۱۹، ۱۶، ۱۵).

اگرچه حضور ویروس H9N2 در طحال، لوزه‌های سکومی و کلواک قبلاً گزارش شده است (۲۰ و ۱۵، ۱۲)، اما در این مطالعه ویروس از طحال، لوزه‌های سکومی و کلواک حضور نداشت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری و ویروس به ترتیب از روزهای ۶ و ۱۰ 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 می‌گردد 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 و کاهش زیان‌های اقتصادی ناشی از آنها مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و سپاسگزاری

از زحمات و همکاری‌های 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 می‌شود. همچنین از زحمات آقایان سید غلامرضا میرزائی و محسن محمودزاده تشکر می‌شود.

فهرست منابع

- ۱- عزیزپور، آ. (۱۳۹۰): مروری بر بیماری آنفلوآنزای پرندگان، فصلنامه علمی-تخصصی طیور، چکاوک، ۲۰(۱): ۴۷-۳۵.
- ۲- عزیزپور، آ.، بکائی، س.، شیخی، ن.، حبیب‌زاده، ش. (۱۳۹۱): بررسی حضور آنتی‌بادی‌های سرمی ضد ویروس آنفلوآنزای مرغی تحت تیپ H9N2 در جمعیت انسانی منطقه اردبیل، مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۱۹(۱): ۶۲۸-۶۱۹.
- 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*

- Pajou. Va. Sazan. 46: 106-109.
- 5- Banani, M., Momayez, R., Pournakhsh, S. A., Goodarzi, H., Bahmani Nejad, M. A. (2002): Simultaneous Isolation of Ornithobacterium Rhinotracheale and Avian Influenza Virus Subtype H9n2 from Commercial Poultry. Iranian. J. Vet. Res. 3(2):100-115.
 - 6- Banani, M., Pournakhsh, 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 Haghdoost, I., Pournakhsh, 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- Haghghat-Jahromi, M., Asasi, K., Nili, H., Dadras, H., Shoostari, 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., Bozorgmehri Fard, 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. J. Vet. Res. 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.

- 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., Bozorgmehrfard, 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 subtype 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.