مطالعه علایم بالینی و کالبدگشایی ناشی از آلودگی تجربی با ویروس آنفلوانزای H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال به صورت انفرادی و همزمان در جوجه‌های SPF

حسین گودرزی[۱]، آیدین عزیزپور[۲*]، منصور بنانی[۱]، عباس نوری[۱]، سعید چرخکار[۳]، رضا ممیز[۱]، محمدحسن حبل‌الورید[۱]، پیمان بیژن‌زاد[٤]، سیدغلامرضا میرزائی[٥]، فاطمه عشرت‌آبادی[٥]، محسن محمودزاده[٥]

چکیده

در این مطالعه علایم بالینی و کالبدگشایی ناشی از آلودگی با ویروس H9N2 (A/chicken/Iran/m.1/2010) و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT-R87-7/1387) به صورت انفرادی و همزمان در جوجه‌های عاری از عوامل بیماریزای خاص (SPF) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، هشتاد قطعه جوجه تفریخ شده از تخم مرغ جنین دار SPF نژاد لگهورن در سن یک روزگی به صورت تصادفی به چهار گروه بیست تایی تقسیم شدند (سه گروه آزمایش و یک گروه کنترل) که در سن ۳ هفتگی جوجه‌های گروه‌های آزمایش به صورت انفرادی و همزمان با عوامل بیماریزا و گروه کنترل با مایع آلانتوئیک تلقیح شدند. در این مطالعه به منظور شناسایی ویروس و باکتری در بافتهای جوجه‌های آلوده شده از آزمایشات مولکولی استفاده شد. گروه‌های آزمایشی باکتری و آنفلوانزای انفرادی علایم بالینی و کالبدگشایی خیلی جزئی را نشان دادند. درحالیکه در گروه همزمان علایم بالینی شدید از قبیل افسردگی، کم اشتهایی، ژولیدگی پرها، اسهال، علایم شدید تنفسی و ۱۵٪ تلفات و همچنین ضایعات بیشتر کالبدگشایی مثل پرخونی نای و ریه، تورم کلیه و تورم کیسه‌های هوایی مشاهده گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد باکتری ORT روی جوجه‌های SPF نژاد لگهورن تاثیر کمی دارد ولی در صورت ابتلا به ویروس آنفلوانزا منجر به افزایش تلفات تا ۱۵٪ و تشدید علایم بالینی و جراحات کالبدگشائی ناشی از آن می‌گردد.

واژگان کلیدی: *ویروس آنفلوانزای H9N2، باکتری ORT، عفونت همزمان، علایم بالینی، جوجه‌های SPF*

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/٦/۳

مقدمه

عفونت‌های تنفسی مهمترین بیماری‌هایی هستند که پرندگان به ویژه طیور صنعتی را درگیر می‌نمایند. این بیماری‌ها به واسطه تلفات سنگین، هزینه درمانی زیاد و کاهش میزان تولید، زیان‌های اقتصادی فراوانی به صنعت مرغداری وارد می‌کنند. عوامل مختلف ویروسی و باکتریائی می‌توانند در ایجاد عفونتهای تنفسی نقش داشته باشند که آنفلوانزای طیور یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی است که تنها تیپ A آن در پرندگان ایجاد عفونت طبیعی می‌نماید (۲۱و۱). تحت تیپ‌های ویروس آنفلونزای نوع A بر اساس دو گلیکو پروتئین هماگلوتینین(HA) و نورآمینیداز(NA) تعیین می‌شود که تاکنون ۱٦نوع HA و ۹ نوع NA شناسایی شده است (۲۱و۲). علی رغم اینکه تحت تیپ H9N2 آنفلوانزا در گروه ویروس‌های با بیماریزائی کم (LPAI) طبقه‌بندی می‌گردد(۲۸)، اما از دهه ۱۹۹۰ میلادی تاکنون گزارش‌های زیادی مبنی بر درگیری گله‌های گوشتی نقاط مختلف جهان با ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 وجود دارد که این تحت تیپ باعث ایجاد خسارات زیادی به صنعت طیور شده است (۱٦و۳). در حالیکه این ویروس به تنهایی در شرایط تجربی و فیلدی فقط قادر به ایجاد بیماری خفیف می‌باشد(۲۱).

براساس گزارش‌های علمی، عوامل مختلفی از قبیل مشکلات مدیریتی، استرس‌های محیطی و عفونت های همزمان باکتریائی و ویروسی در تشدید عوارض و تلفات آنفلوانزا دخیل هستند(۲۱).

۱- اعضای هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج ، ایران
۲- دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانش آموخته دکتری تخصصی بیماریهای طیور، تهران، ایران (Aidin_azizpour@yahoo.com)
۳- دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه بیماریهای طیور، تهران، ایران.
٤- دانشگاه آزاداسلامی، واحد تبریز، گروه علوم درمانگاهی، تبریز، ایران.
٥- کارشناس بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.

بیماری تنفسی ناشی از اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) عفونتی باکتریایی است که اخیرا به فهرست دیگر عفونت‌های باکتریایی تنفسی طیور افزوده شده است. اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال باکتری گرم منفی، پلی مورفیک و غیر متحرک است که چه به تنهایی و چه به کمک سایر پاتوژن ها و یا عوامل غیر عفونی سبب مشکلات تنفسی، کاهش رشد و تولید، افزایش ضریب تبدیل غذایی و تلفات در ماکیان و بوقلمون می‌شود (۲۶و۲۵، ۱۱، ۷).

با توجه به اینکه این دو بیماری به تنهائی عوارض مهمی در جوجه‌ها ایجاد نمی‌کنند(۲۱و۹، ۷، ٦). انجام عفونت تجربی در جوجه‌های عاری از عوامل بیماریزای خاص(SPF) (Specific Pathogen Free) با سویه‌های جدا شده از این دو بیماری در مرغداری های کشور می‌تواند در استراتژی مبارزه و پیشگیری از بیماری سندرم تنفسی و کاهش زیان‌های اقتصادی ناشی از آن حائز اهمیت باشد.

هدف از مطالعه حاضر بررسی علایم بالینی و کالبدگشایی عفونت های ناشی از ویروس H9N2 و باکتری ORT در جوجه‌های SPF به صورت انفرادی و همزمان می‌باشدکه جهت شناسایی ویروس و باکتری در بافتهای جوجه‌های آلوده شده از آزمایشات مولکولی استفاده شد.

مواد و روش کار

آماده‌سازی نمونه‌های تلقیح

ویروس H9N2

در این مطالعه از ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 (A/chicken/Iran/m.1/2010) استفاده شد. عیار ویروس با تلقیح ۰/۲ میلی‌لیتر از رقت های متوالی بر مبنای یک دهم (10^{-9}–10^{-2}) بذر ویروسی در PBS در داخل فضای کورویوآلانتوئیک تخم مرغ های جنین‌دار ۱۱ روزهSPF محاسبه گردید. بطوریکه هر رقت مورد نظر در ۳ تخم مرغ در زیر دستگاه لامینارفلو کلاس II تلقیح و سپس تخم مرغ‌ها به مدت ۷ روز در دمای 37^{oC} نگهداری شدند. مرگ و میر در ۲٤ ساعت اولیه غیر اختصاصی بود. اما تلفات جنینی ٤۸ تا ۹٦ ساعت پس از تلقیح به یخچال 4^{oC} منتقل گردیدند و مایع‌های آلانتوئیک آنها در شرایط استریل برداشت و در شرایط عاری از آلودگی‌های باکتریایی و قارچی در درجه حرارت کمتر از -40^{oC} ذخیره شدند. در پایان روز ۷ پس از تلقیح، مایع آلانتوئیک جنین‌های تلف شده با آزمایش‌های هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفتند. عیار ویروس بصورت ۵۰ ٪ دوز عفونی کننده جنین (EID50) به روش اسپرمن ـ کاربر محاسبه شد(۲۹).

باکتری ORT

در این بررسی جدایه ایرانی باکتری ORT با مشخصات-ORT R87-7/1387(JF810491) استفاده شد. این جدایه بوسیله آزمایش‌های PCR و ERIC-PCR مورد شناسایی قرار گرفت و میزان باکتری پس از کشت در محیط بلاد آگار و BHI به صورت CFU 1×10^{10} به روش Reed and Muench (۱۹۳۸) محاسبه شد(۱۹).

لازم بذکر است که جدایه‌های ویروسH9N2 و باکتریORT مورد استفاده در این تحقیق از بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور موسسه رازی دریافت شد که با آزمایشات ملکولی مورد تائید قرار گرفتند.

پرندگان

هشتاد قطعه جوجه SPF نژاد لگهورن در سن یک روزگی بصورت تصادفی در ٤ 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.

شرایط آزمایش

در سن ۲۱ روزگی تمامی پرندگان در گروه آزمایشی آنفلوانزای انفرادی با عیار EID50 10^{6} در ۰/۱ سی سی از مایع

کوریوالانتوئیک عفونی حاوی ویروسH9N2 به روش قطره چشمی و گروه باکتری انفرادی به میزانCFU ۱×۱۰^{۱۰} در ۰/۵ سی سی حاوی باکتری ORT به روش داخل نای تلقیح شدند و همچنین گروه آزمایشی همزمان به روش قطره چشمی به ویروس H9N2 با عیار EID50 $۱۰^{٦}$ و باکتری ORT به روش داخل نای به مقدار CFU ۱×۱۰^{۱۰} آلوده شدند. گروه چهارم نیز بعنوان گروه کنترل انتخاب و صرفاً مایع آلانتوئیک به روش قطره چشمی جهت تلقیح استفاده گردید. تا دو هفته پس از چالش، 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 و بعد از کالبدگشایی نمونه‌برداری انجام گرفت و همچنین علائم کالبدگشایی نیز در صورت موجود بودن ثبت گردید. نمونه‌ها از بافت‌های مختلف از قبیل نای و ریه‌ها جهت شناسایی ویروسH9N2 و باکتری ORT با استفاده از روش مولکولی اخذ گردید. لازم بذکر است که نمونه‌های بافتی با دستگاه آسیاب کننده بافت صلابه گردید و سپس با افزودن بافر نمکی فسفاته(PBS) به نسبت ۱۰ ٪ به صورت سوسپانسیون هموژنیزه در آمد. جهت عاری کردن نمونه‌ها از آلودگی‌های باکتریایی احتمالی آنتی بیوتیک های زیر به محلول اضافه شدند: (پنی سیلین ـ ۱۰۰۰۰ IU/ml، استرپتومایسین ـ ۱۰۰۰۰ µg/ml، جنتامایسین ـ ۱۰۰۰ µg/ml، آمفوتریسینB - ۵ µg/ml و تایلوزین- ۳۰۰ µg/ml) . این نمونه‌های آماده شده تا انجام مراحل بعدی (ردیابی مولکولی) در فریزر ۷۰°C- نگهداری شدند.

ردیابی ویروسH9N2 چالش شده به روش مولکولی

-استخراج RNA ویروسی

پس از خارج کردن نمونه بافتی ذخیره شده هر گروه از فریزر ۷۰°C- به آن اجازه داده شد تا در دمای آزمایشگاه ذوب شود. برای استخراج RNA از کیت تجاری(RNX (CinnaGen,Iran براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت استفاده شد(۲۰).

- انجام واکنش RT-PCR برای ردیابی ویروس

برای ردیابی ژن H9 آنفلوانزا از روش RT-PCR استفاده شد (جدول ۱). برای این کار ابتدا از آغازگرهای مستقیم (HU1) و معکوس (HU2) که توسط Lee و همکاران (۲۰۰۰) طراحی شده بود(۱۳)، استفاده شد. جهت انجام آزمایش RT-PCR از کیت تک مرحله‌ای ساخت شرکت Roche استفاده گردید.

جدول ۱ـ توالی نوکلئوتیدی وجایگاه آغازگرهای مورد استفاده در ردیابی ویروس آنفلوانزا

الیگونوکلئوتید	ژن	توالی	اندازه قطعه تولید شده
Forward(HU1)	H9	5´-TATGGGGCATACAYCAYCC-3´	٤٨٦
Reverse(HU2c)	H9	5´- TCTATGAACCCWGCWATTGCTCC -3´	٤٨٦

-آماده کردن مخلوط اصلی

واکنش PCR با استفاده از ٤ میکرولیتر از RNA استخراج شده در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. سپس لوله‌ها به دستگاه ترموسایکلر انتقال یافته و تحت برنامه دمایی از قبل تنظیم شده جهت انجام واکنش رونوشت برداری معکوس و PCR قرار می‌گرفتند.

- انجام واکنش رونوشت برداری معکوس و PCR

جهت انجام مرحله رونویسی معکوس، مخلوط حاصل در دمای ٤٥°C به مدت ٤٥ دقیقه قرار داده شد و بعد ۳ دقیقه در دمای ٩٤°C قرار گرفت. سپس واکنش PCR انجام گردید که تعداد چرخه برنامه ریزی شده در این مرحله، ٣٤ چرخه بود. پس از اتمام مرحلهٔ فوق، محصول PCR با انجام الکتروفورز در

ژل آگارز ۱٪ حاوی SYBR safe با استفاده از اشعه UV مشاهده، در آخر تصویر ژل تهیه گردید.

شناسایی باکتری ORT تلقیح شده به روش ملکولی

– استخراج DNA

به اختصار شامل مراحل لیز سلولی، ترسیب پروتئین و تخلیص DNA بود(٤).

– انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)

در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی ORT به نام‌های OR16S-F1 و OR16S-R1 که بر اساس سکانس ژن 16S rRNA طراحی و تهیه شده بودند برای ردیابی باکتری ORT استفاده شد که ردیف‌های بازی آنها به شرح جدول ۲ می‌باشد(۱۱و۷).

جدول ۲ـ ردیف‌های بازی وجایگاه آغازگرهای 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´	۷۸٤
OR16S-R1	16S rRNA	5´- TTC GCTTGG TCT CCG AAG AT-۳´	۷۸٤

–آماده کردن مخلوط اصلی

در هر بار آزمایش PCR، با احتساب تمام نمونه‌های مورد آزمایش و همینطور کنترل‌های مثبت و منفی و با یک نمونه بیشتر، مخلوط اصلی محاسبه و تهیه گردید. در این مطالعه حجم هر نمونه واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

– برنامه سیکل حرارتی در دستگاه ترموسایکلر

مخلوط PCR به منظور واسرشت اولیه و تفکیک دو رشته DNA به مدت ۷ دقیقه در دمای ۹٤^{oC} قرار گرفت. سپس سیکل‌های متوالی شامل مرحله واسرشت ثانویه ۳۰ ثانیه در ۹٤^{oC}، مرحله اتصال ۱ دقیقه در دمای ۵۳^{oC} و مرحله ساخت ۲ دقیقه در دمای ۷۲^{oC} به تعداد ۳۰ سیکل و در انتها یک مرحله ساخت نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲^{oC} در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) تنظیم شد. پس از اتمام مرحلهٔ فوق، محصول PCR به نسبت ۵ به یک با بافر Loading مخلوط و به گودهای تعبیه شده در ژل آگارز ۱٪ حاوی SYBR safe منتقل و با استفاده از اشعه UV بررسی شدند.

نتایج

علائم بالینی و کالبدگشایی گروه‌های مورد مطالعه

۱. گروه کنترل

درجوجه‌های این گروه هیچ گونه علایم بالینی، ضایعات کالبدگشایی و تلفات مشاهده نگردید.

۲.گروه باکتری انفرادی(ORT)

علائم بالینی: تعداد بسیار معدودی از جوجه‌های آلوده شده با باکتری ORT از روز سوم پس از تلقیح، دچار کزکردگی شدند که علایم مزبور از روز پنجم ناپدید گردید. درطول آزمایش هیچ گونه جراحات کالبدگشایی و تلفات مشاهده نشد.

۳. گروه آنفلوانزا انفرادی (H_9N_2)

علائم بالینی: تعداد معدودی از جوجه‌های تلقیح شده با ویروس H9N2 در روز چهارم پس از تلقیح، کزکردگی و ژولیدگی پرها داشتند که این علایم از روز ششم پس از تلقیح مشاهده نگردید.

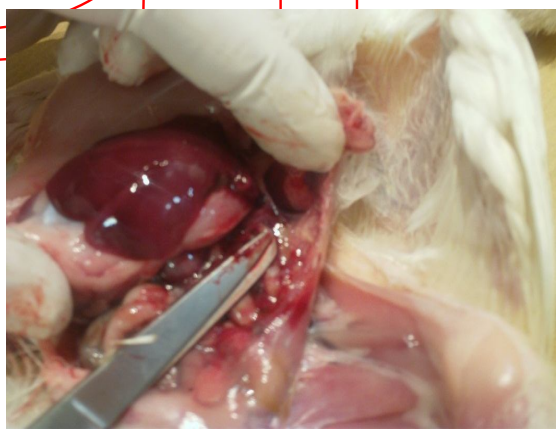
از نظر کالبدگشایی در طی مطالعه، در نای، کبد، کلیه‌ها، طحال، لوزه‌های سکومی، بورس فابریسیوس و تیموس علایم خاصی مشاهده نگردید، اما در روز٦ پس از تلقیح، پنومونی در ریه‌ها وجود داشت و در طول مطالعه تلفاتی در این گروه ثبت نشد.

٤.گروه همزمان (H9N2+ORT)

علائم بالینی: تعدادی از جوجه‌های آلوده شده بطور همزمان با دو عامل بیماری از روز دوم پس از تلقیح، کم اشتهایی، کزکردگی، ژولیدگی پرها و مشکل شدید تنفسی (با دهان باز

تنفس کردن) را نشان دادند و در این روز نیز یک جوجه دارای تاج و ریش سیانوزه بود و روز سوم پس از تلقیح، تعدادی بسیار معدودی از جوجه‌ها اسهال داشتند. بیشترین علایم بالینی در روز سوم بعد از چالش مشاهده گردید، اما علایم از روز ششم پس از تلقیح بسیار کم شد. بطوریکه فقط مختصری علایم ملایم تنفسی و کزکردگی داشتند و از روز دهم پس از تلقیح هیچ گونه علایم بالینی مشاهده نگردید. در طی مطالعه سه قطعه تلفات به ترتیب در روزهای ۲، ۳ و ۵ پس از تلقیح مشاهده گردید.

علایم کالبدگشایی: شامل پرخونی ملایم تا شدید نای، تورم کیسه‌های هوایی و پنومونی بود که از روز ۲ پس از تلقیح دیده شد (نگاره ۱). در جوجه تلف شده روز دوم پس از تلقیح، التهاب و پرخونی شدید نای، تورم کیسه‌های هوایی، پنومونی یک طرفه، تورم کلیه‌ها و وجود کست پنیری در محل دو شاخه شدن نای مشاهده گردید، در جوجه تلف شده روز سوم پس از تلقیح، پرخونی ملایم نای، تورم کلیه ها و کبد، تورم و چرکی شدن کیسه های هوایی و وجود کست پنیری در محل دو شاخه شدن نای و در جوجه تلف شده روز پنجم پس از تلقیح چرکی شدن کیسه‌های هوایی و التهاب ملایم نای دیده شد.

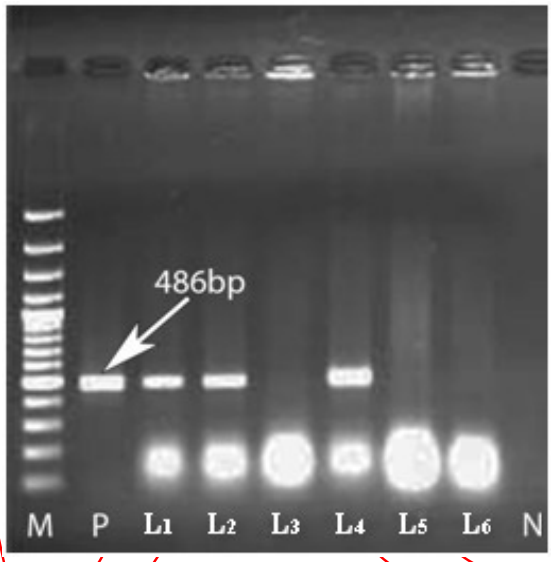


نگاره ۱ـ تورم و کدر شدن کیسه‌های هوایی در جوجه گروه همزمان در روز دوم پس از تلقیح

شناسایی ویروس و باکتری

در نمونه‌هایی که قبل از تلقیح اخذ گردیده بودند و همچنین در نمونه‌های اخذ شده از گروه کنترل هیچ گونه ویروس و باکتری شناسایی نگردید.

درتحلیل الگوی الکتروفورزی محصول RT-PCR بدست آمده، باندهای الیگونوکلئوتیدی تکثیر یافته در طول‌های تقریبی ٤٨٦ باز نوکلئوتیدی مربوط به هر نمونه، نشانه وجود ژنوم RNA ویروس H9N2 بود (نگاره ۲).



نگاره ۲ـ شناسایی تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا از بافت‌ها به روش RT-PCR

چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک P: کنترل مثبت (ویروس H9N2 تایید شده با روش جداسازی و PCR). چاهک های L1- L6: نمونه‌های تحت آزمایش. چاهک N: آب (کنترل منفی).

در روشPCR، باند قطعه ٧٨٤ جفت بازی در تمامی نمونه‌های ORT تحت آزمایش با روش PCR که موید ORT بودن است، مشاهده گردید (نگاره ۳).

نگاره ۳ـ قطعه ۷۸٤ جفت بازی ژن 16S-rRNA در باکتریهای ORT مورد مطالعه
چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک ۱: آب (شاهد منفی). چاهک‌های ۲-۱۱: نمونه‌های تحت آزمایش. چاهک ۱۲: شاهد مثبت(باکتری ORT تایید شده با تست‌های بیوشیمیایی و آنتی سرم اختصاصی سوتیپ A).

بحث

ویروس H9N2 آنفلوانزا اولین بار در سال ۱۳۷۷ در طیور صنعتی ایران مشاهده گردید(۲۷). سپس همه‌گیری وسیع آن در جوجه‌های گوشتی تجاری توسط نیلی و اساسی در سال ۲۰۰۳ گزارش گردید(۱۷) و از آن زمان تاکنون این بیماری تبدیل به یکی از بیماریهای مهم تنفسی صنعت طیور کشور گردیده است. با اینکه در مطالعات وصفی مرندی و بزرگمهری فرد (۲۰۰۲)، این تحت تیپ را در گروه نه چندان بیماری‌زا (Non – HPAI) قرار داده شده است (۲۸)، ولی در طی این چند سال اخیر به صورت اپیدمی شدید با تلفات تا ٦٥ ٪ و کاهش تولیدتخم تا ۷۵ ٪ در اثر آلودگی با این ویروس در گله‌های تجاری گزارش شده است(۱۷و۱٦). علت تلفات بالای ناشی از این ویروس دقیقاً مشخص نیست زیرا بر اساس مطالعات مختلف، ویروس‌های با بیماریزایی کم آنفلوانزای پرندگان در طیور اهلی موجب بروز علایم بالینی و بیماری تنفسی ملایمی می‌شوند که با تلفات پائینی همراه است، که معمولاً از ۵ ٪ تجاوز نمی‌نماید(۲۱). 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(۲۱ و ۲۰، ۱۸، ۱۰).

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). مطالعات انجام شده نشان داد که برخی سویه‌های باکتری ORT به تنهایی در جوجه‌های 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(۲٦ و ۲۳، ۱۸، ۱٤، ۸، ۷، ۵). بطوریکه 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). با این وجود مطالعات کاملی بر روی عفونت همزمان ویروس H9N2 و باکتری ORT انجام نگرفته است. بدین جهت لازم شد تا مطالعه ای تجربی بر روی عفونت های ناشی از ویروس آنفلوانزای H9N2 و باکتری ORT که قبلا از گله‌های تجاری جداسازی و در موسسه رازی نگهداری می‌شد، صورت گیرد تا علایم بالینی و عوارض کالبدگشایی در گروه‌های آزمایشی حاصل از ویروس H9N2 و باکتری ORT بطور انفرادی و همزمانی بررسی شود.

نتایج حاصل از مطالعه Pan و همکاران (۲۰۱۲)، بطور تجربی در جوجه‌های گوشتی ۳ هفته نشان داد که علائم بالینی از قبیل 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 ۲ تا ۵ پس از تلقیح و همچنین علایم کالبدگشایی از قبیل پرخونی و خونریزی منتشره در مجرای تنفسی (نای و ریه‌ها)، تورم کیسه‌های هوایی، پریکاردیت، پریتونیت و پنومونی در گروه‌های ORT انفرادی، تقدم آلودگی با ORT و همزمان (ORT + H9N2) مشاهده گردید که تلفات در گروه‌های باکتری انفرادی، همزمان و تقدم آلودگی با باکتری به ترتیب ۵۰، ۷۰ و ۸۰٪ گزارش شد. درحالیکه در گروه‌های تقدم آلودگی با آنفلوانزا و آنفلوانزای انفرادی علایم بالینی و کالبدگشایی به مراتب کمتر از گروه‌های فوق‌الذکر بود که فقط علایم پنومونی به مدت ٤ روز دیده شد. تلفات در گروه‌های تقدم آلودگی با آنفلوانزا و آنفلوانزای انفرادی به ترتیب ۳۰٪ و ۱۰٪ گزارش گردید که از روز ٤ پس از تلقیح مشاهده گردید (۱۸). نتایج فوق با مطالعه حاضر در گروه آلودگی تجربی تنها با باکتری ORT تفات دارد به گونه‌ایی که در مطالعه حاضر در این گروه تلفاتی مشاهده نشد. این مساله همانطور که Pan و همکاران (۲۰۱۲)، نیز عنوان نموده‌اند مربوط به حدت غیر معمول باکتری ORT می‌باشد. همچنین در این مطالعه، گروه مربوط به تقدم آلودگی با باکتری تلفات بیشتری را نشان می‌دهد (۱۸) که این امر با نتایج مطالعه حاضر کاملا متفاوت می‌باشد. اما وجود تلفات بیشتر همراه با علایم بالینی و کالبدگشایی شدیدتر در گروه عفونت همزمان در هر دو مطالعه شباهت دارد.

سیفی و همکاران (۲۰۱۲)، در آزمایش تجربی عفونت همزمان آنفلوانزا و سروتیپ ٤/۹۱ برونشیت در جوجه‌های گوشتی بیان کردند که ۷۵ – ۵۰٪ ازجوجه‌های تلقیح شده با این دو ویروس بین روزهای ۲ تا ۸ پس از تلقیح علایم بالینی و جراحات کالبدگشایی شدیدی را نشان دادند. در حالیکه در گروه‌های آنفلوانزا و برونشیت انفرادی علایم بالینی و کالبدگشایی با شدت کمتری مشاهده گردید. همچنین در این تحقیق گزارش کردند که میزان تلفات ناشی از تلقیح این دو ویروس در جوجه‌های گوشتی در مقایسه با گروه‌های انفرادی آنفلوانزا و برونشیت (هرکدام ۵٪) بطور معنی‌دار افزایش و به میزان ۲۰٪ رسید(۲۰).

Thachil و همکاران (۲۰۰۹)، در مرغان تخم‌گذار SPF نژاد لگهورن ۸ هفته نشان دادند که در گروه‌هایی که بطور همزمان با ویروس برونشیت و باکتری E.coli تلقیح شده بودند و بعد از ۵ روز در معرض آلودگی ثانویه با اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال قرار گرفتند، در مقایسه با گروه‌های برونشیت انفرادی، IBV+E.coli، IBV+ORT علایم بالینی شدیدی ایجاد گردید و در گروه‌های IBV+E.coli و IBV+E.coli + ORT به ترتیب دو و سه قطعه تلفات در روز ۲ پس از تلقیح همزمان برونشیت و *E.coli* مشاهده گردید. بعد از آلودگی ثانویه باORT در هیچ گروهی به جز گروه ORT +IBV+E.coli یک قطعه تلفات در روز ۱۶ پس از تلقیح با ORT دیده نشد. علایم کالبدگشایی از قبیل تورم کیسه های هوایی، پرخونی شدید نای و ریه و پریکادریت در گروه‌های همزمان ویروس برونشیت و باکتری E.coli و ORT + IBV+E.coli در روزهای ۲ و ٤ پس از آلودگی ثانویه با ORT وجود داشت. در حالیکه در جوجه‌های آلوده شده با باکترهای E.coli و ORT به صورت انفرادی هیچ گونه علایم بالینی، کالبدگشایی و تلفاتی گزارش نگردید(۲۳).

حقیقت جهرمی و همکاران (۲۰۰۸)، 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. همچنین آنها گزارش کردند گروهی که فقط با ویروس H9N2 تلقیح شده بود علایم بالینی و کالبدگشایی به مراتب کمتری داشته و تلفاتی مشاهده نگردید (۱۲).

در یک مطالعه تجربی با تلقیح داخل بینی ویروس H9N2 آنفلوانزا در جوجه‌های تجارتی در سن ۳۵ روزگی علائم بالینی شامل ادم صورت، کونژاکتیویت، کزکردگی، ترشح شدید اشک، ژولیدگی پرها، کاهش مصرف دان و آب، سرفه، عطسه و تورم سینوس تحت حدقه‌ای بود. همچنین در دو پرنده علائم سیانوز تاج و ریش در روز ۳ پس از تلقیح مشاهده گردید. علائم کالبدگشایی نیز شامل خونریزی در روده کوچک و تورم کلیه‌ها بود که در روز ٦ پی از تلقیح به حداکثر خود رسید(۱۵).

Bano و همکاران (۲۰۰۳)، با تلقیح جدایه A/chicken/Pakistan/31/01(H9N2) ویروس آنفلوانزا با روش‌های مختلف به ماکیان نشان دادند که تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا علائم بالینی خاصی را ایجاد نمی‌نماید و تنها در سیستم تنفسی تکثیر نموده و نمی‌تواند تکثیر سیستمیکی داشته باشد(٦).

نیلی و اساسی (۲۰۰۳و ۲۰۰۲)، در مطالعه تجربی با تلقیح عصاره خام گرفته شده از نای طیور مشکوک به بیماری آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 و تلقیح آن به صورت تجربی به جوجه‌های گوشتی، تلفات تا ۱۹٪ مشاهده کردند (۱۷و۱٦). شاید حضور همزمان عوامل بیماریزای دیگر در این عصاره ی خام باعث ایجاد این میزان تلفات شده است. در تحقیق حاضر با اضافه کردن آنتی بیوتیک های مختلف به نسبت مشخص به عصاره خام، امکان حضور پاتوژن‌های باکتریایی را در آنها از بین بردیم. همچنین در تحقیق حاضر نمونه ای که برای آزمایش تجربی انتخاب و استفاده شدند از لحاظ آلودگی با ویروس نیوکاسل نیز بررسی شد که تمام موارد منفی بود.

در این تحقیق نتایج گروه تلقیح شده با آنفلوانزا به صورت انفرادی با یافته‌های سیفی و همکاران (۲۰۱۲)، Pan و همکاران (۲۰۱۲)، مصلح و همکاران (۲۰۰۹) و نیلی و اساسی(۲۰۰۳و ۲۰۰۲) تفاوت دارد(۲۰ و ۱۸، ۱۷، ۱٦، ۱۵) ولی با یافته های حقیقت جهرمی و همکاران (۲۰۰۷) و بانو و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد(۱۲و٦). به نظر می‌رسد که فاکتورهایی نظیر مدیریت، عفونت‌های همزمان باکتریایی یا ویروسی، عوامل تضعیف کننده، ایمنی، سن، سویه و نژاد جوجه‌ها عمده‌ترین دلیل اختلاف بیماریزایی جدایه‌های ویروس H9N2 می‌باشد.

در مطالعات صورت گرفته بطور تجربی در جوجه‌های گوشتی ۲ و ٦ هفته تلقیح شده با باکتری ORT هیچ گونه علایم بالینی و کالبدگشایی گزارش نشد(۲۵و ۹) و همچنین در یک مطالعه تجربی دیگر در جوجه‌های SPF نژاد لگهورن ۲ هفته آلوده شده با باکتری ORT علایم بالینی و تنفسی مشاهده نگردید ولی ضایعات کالبدگشایی در کیسه های هوایی و ریه مشهود بود(۲٤).

در مطالعه حاضر، یافته‌های بدست آمده از گروه باکتری انفرادی با یافته‌های Pan و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی ندارد(۱۸) ولی با نتایج Van Empel و همکاران (۱۹۹٦)، Franz و همکاران (۱۹۹۷) و Thachil و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد(۲۵ و ۲۳ ،۹). این اختلاف احتمالا به نوع و بیماری‌زایی سویه‌های باکتری مورد استفاده و روش تلقیح آن و یا نوع نژاد، سویه و سن پرنده برمی‌گردد.

در تحقیق حاضر، علایم بالینی از قبیل کزکردگی، ژولیدگی پرها، کم شدن مصرف آب و دان، ترشحات چشمی و بینی، مشکل تنفسی و اسهال در گروه‌های مورد مطالعه ثبت شد که نتایج حاکی از آن است که شدت علایم در گروه‌هایی که به طور همزمان با ویروس H9N2 و باکتری ORT تلقیح شده اند، بیشتر از گروه‌های دیگر می‌باشد. شدت ضایعات کالبدگشایی مثل پرخونی نای، پرخونی ریه، تورم کلیه و تورم کیسه‌های هوایی در گروه‌هایی که همزمان به دو عامل آلوده شده بودند، بیشتر از گروه‌های دیگر دیده شد. نکته قابل توجه در علایم بالینی وجود مشکل شدید تنفسی و Gasping در روزهای ۲ تا ۵ پس از تلقیح و در ضایعات کالبدگشایی وجود Cast در ناحیه دو شاخه شدن نای در گروه همزمان بود که درسایر گروه‌ها مشاهده نگردید. نکته قابل ذکر دیگر وجود تلفات فقط در گروه

همزمان (۱۵٪) بود.درحالیکه در گروه‌های باکتری و آنفلوانزای انفرادی هیچ گونه تلفاتی دیده نشد.

این نتایج نشان می‌دهد که باکتری ORT روی جوجه‌های SPF نژاد لگهورن تاثیر کمی دارد ولی در صورت ابتلا به ویروس آنفلوانزا منجر به افزایش تلفات تا ۱۵ ٪ و تشدید علایم بالینی و جراحات کالبدگشائی ناشی از آن می‌گردد که نتایج بدست آمده با نتایج مطالعات Pan و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی دارد(۱۸).

با توجه به اهمیت عفونت همزمان پیشنهاد می‌گردد که نقش سایر عوامل بیماری‌زا نظیر ویروس برونشیت عفونی، نیوکاسل، ایشریشیاکولی، هموفیلوس پاراگالیناروم و مایکوپلاسما در عوارض حاصل از بیماری در نژادهای مختلف گوشتی تجاری بررسی گردد تا در استراتژی مبارزه و پیشگیری از بیماری کمپلکس تنفسی وکاهش زیان‌های اقتصادی ناشی از آنها مورد توجه قرار گیرد.

فهرست منابع

۱- عزیزپور، آ.(۱۳۹۰): مروری بر بیماری آنفلوانزای پرندگان، فصلنامه علمی ـ تخصصی طیور، چکاوک، ۲۰(۱): ۴۷-۳۵.

۲- عزیزپور، آ.، بکائی، س.، شیخی، ن.، حبیب‌زاده، ش. (۱۳۹۱): بررسی حضور آنتی بادی‌های سرمی ضد ویروس آنفلوانزای مرغی تحت تیپ H9N2 در جمعیت انسانی منطقه اردبیل، مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۹(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 rhinotracheale from a broiler and a pullet flock. 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. 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.
7. 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 .
8. 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.
9. Franz, G., Hein, R., Bricker, J., Walls, P., Odor, E., Salem, M., Sample, B.(1997): Experimental studies in broilers with a Delmarva *Ornithobacterium rhinotracheale* isolate. 46th Western Poulty Diseases Conference, Sacramento:46–48 .
10. 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.
11. Hafez, M. H. (2002): Diagnosis of Ornithobacterium rhinotracheale. Inter. J. Poultry Sci. 1: 114-118.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. Nili, H., Asasi, K. (2002): Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chicken in Iran. Avian. Pathol. 31: 247-252.
17. Nili, H., Asasi, K. (2003): Avian Influenza (H9n2) Outbreak in Iran. Avian. Dis. 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. Reed, L. J., Muench, H.(1938): A simple method of estimation of 50% end points. Am. J. Hyg. 27: 493–497.
20. Seifi, S., Asasi, K., Mohammadi, A. (2012): An experimental study on broiler chicken co-infected with the specimens containing avian influenza (H9 subtype) and infectious bronchitis (4/91 strain) viruses. Iranian. J. Vet. Rese.13:138 -142.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Van Veen, L., Van Empel, C. P., Fabria, T. (2000) : Ornithobacterium rhinotracheale, a primary pathogen in broilers. Avian. Dis. 44:896–900.
25. Van Empel, P., Van den Bosch, H., Goovaerts, D., Storm, P. (1996) : Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. Avian. Dis. 40:858–864.
26. Van Empel, P. C. M., Hafez, H. M. (1999) : Ornithobacterium rhinotracheale: a review. Avian. Pathol. 28: 217- 227.
27. 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, ;67-69
28. 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.
29. 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.