

# مطالعه تجربی ضایعات هیستوپاتولوژیک آلودگی ثانویه با ویروس H9N2

## آنفلوانزا متعاقب عفونت با باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال در جوجه‌های SPF

آیدین عزیزپور<sup>۱\*</sup>، زهرا امیرعجم<sup>۲</sup>، راحم خوشبخت<sup>۳</sup>، نورالدین حسین پور آزاد<sup>۱</sup>

### چکیده

هدف از این مطالعه بررسی نوع، شدت و میزان جراحات بافتی عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا متعاقب تلقیح با باکتری ORT در جوجه‌های SPF بود. بدین منظور، تعداد ۶۰ قطعه جوجه SPF نژاد لگهورن یک روزه به صورت تصادفی در سه گروه بیست تایی تقسیم شدند. در سن ۲۱ روزگی جوجه‌های گروه اول فقط با باکتری ORT و گروه دوم ابتدا با باکتری ORT و سه روز بعد با تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا تلقیح شدند و گروه سوم بعنوان کنترل صرفاً PBS دریافت کردند. نمونه‌های بافتی از نای، ریه، کبد، کلیه، بوس، فابریسیوس، تیموس، طحال و لوزه‌های سکومی جهت مطالعه هیستوپاتولوژی اخذ گردید و پس از آماده سازی و تهیه‌ی مقاطع بافتی با روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. در جوجه‌های گروه اول، باکتری ORT علاوه بر ایجاد ضایعات بافتی در ارگان‌های دستگاه تنفس (از بین رفتن مژه‌ها همراه با ارتشاح تک هسته ایها در زیر مخاط نای، پرخونی و پنومونی در ریه‌ها)، کبد (پرخونی سینوزوئیدها و سیاهرگ مرکزی) و کلیه‌ها (خونریزی و نکروز لوله‌های ادراری) در ارگان‌های سیستم ایمنی نیز سبب ضایعات بافتی نظیر تخلیه لنفوسیتی در بوس فابریسیوس، پرخونی و ارتشاح هتروفیلی در تیموس و افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی در طحال و لوزه‌های سکومی شد. جراحات هیستوپاتولوژی در جوجه‌های گروه دوم نسبت به گروه اول شدیدتر و طولانی مدت بود. هیچ گونه تغییرات بافتی در گروه کنترل مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که جوجه‌های عفونی شده با باکتری ORT در صورت آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا سبب افزایش شدت و طولانی شدن جراحات هیستوپاتوژی ناشی از باکتری ORT می‌شود.

واژگان کلیدی: باکتری ORT، ویروس H9N2 آنفلوانزا، آلودگی ثانویه،

ضایعات هیستوپاتولوژی، جوجه‌های SPF

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۴

### مقدمه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) عامل بیماری اورنیتوباکتریوز می‌باشد و بعنوان یک عامل بیماریزای باکتریایی در ماکیان، بوقلمون و برخی گونه‌های دیگر پرندگان شناخته شده است (۱، ۲). ORT به فوق خانواده باکتری‌های rRNA تعلق دارد و در رده سیتوفاگالووباکتریوم - باکترئیدس قرار می‌گیرد (۱). با توجه به سرعت گسترش این بیماری در صنعت طیور بویژه در کمپلکس‌های تنفسی، خسارات اقتصادی آن در گله‌های تجاری شامل افزایش میزان تلفات و موارد حذف کشتارگاهی، بالا رفتن هزینه‌های درمانی، کاهش میزان تولید تخم مرغ، افزایش ضریب تبدیل غذایی، کاهش کیفیت تخم مرغ و کاهش رشد می‌باشد (۱-۴).

بطور کلی اغلب گله‌های تجاری در اروپا، آفریقا، آمریکای شمالی و جنوبی و اکثریت کشورهای آسیایی با باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال مواجه شده‌اند (۱، ۲). اما اولین وقوع عفونت ORT در طیور صنعتی ایران در سال ۱۳۷۹ بوده است (۳) و در طی دهه‌های اخیر در کمپلکس‌های تنفسی طیور همراه با بیماری آنفلوانزا در کشور گزارش شده است (۵). متعاقباً حضور اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال در بوقلمون

۱- دانشکده کشاورزی مشکین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

Aidin\_Azizpour@uma.ac.ir

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

پرنندگان گروه دوم سه روز بعد میزان ۰/۱ سی سی از مایع کوریوالانتویک عفونی حاوی  $EID_{50} \times 10^6$  و ویروس آنفلوانزای  $H_9N_2$  (A/chicken/Iran/m.1/2010) به روش قطره چشمی تلقیح گردید. در پرنندگان گروه سوم بعنوان گروه کنترل فقط PBS به روش قطره چشمی استفاده شد. در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ پس از تلقیح اولیه با باکتری، تعداد سه پرنده از گروه‌های آزمایش و کنترل به صورت تصادفی انتخاب و ضمن آسان کشی مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. سپس از بافت‌هایی نظیر نای، ریه ها، کبد، کلیه ها، بورس فابریسیوس، تیموس، طحال و لوزه های سکومی نمونه برداری به عمل آمد. البته لازم بذکر است که در خصوص گروه دوم آزمایش نمونه برداری از روز ۶ پس از تلقیح اولیه با باکتری صورت گرفت.

#### آزمایش هیستوپاتولوژی

نمونه‌های اخذ شده از اندام های مختلف به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد فیکس و جهت مطالعه ضایعات بافتی به بخش پاتولوژی ارسال گردید. نمونه‌ها پس از طی مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی با پارافین و قالب‌گیری به ضخامت های ۶-۵ میکرومتر برش داده شدند. مقاطع تهیه شده پس از پارافین‌زدایی و رنگ‌آمیزی با روش هماتوکسیلین و اتوزین مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱، ۱۲). پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی از بافت‌های مختلف گروه‌های آزمایش و کنترل، این مقاطع از لحاظ جراحات بافتی مورد بررسی قرار گرفتند. انواع جراحات مشاهده شده براساس شدت آن از ۱+ تا ۴+ (۱+) بافت طبیعی، ۲+: آسیب جزئی، ۳+: آسیب متوسط، ۴+: آسیب شدید) درجه‌بندی شدند (۱۳).

#### آنالیز آماری

و سایر نژادهای ماکیان و حتی برخی گونه‌های غیر از ماکیان نیز در کشور گزارش شده است (۲).

اگرچه باکتری ORT به تنهایی به عنوان عوامل اولیه قادر به ایجاد بیماریزایی و ضایعات آسیب شناسی در پرنندگان عفونی می‌شود (۱-۴). عوامل عفونی و غیر عفونی نظیر بیماری‌های ویروسی و باکتریایی، شرایط جغرافیایی، مسائل مدیریتی و تغذیه‌ای و استرس‌های محیطی می‌توانند سبب تشدید شدن عوارض ORT در پرنندگان مبتلا شوند (۱، ۶-۱۰). با این وجود تاکنون مطالعاتی در خصوص اثر عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا بر ضایعات آسیب شناسی ناشی از باکتری ORT در جوجه‌های SPF انجام نشده است تا ضایعات بافتی این نوع عفونت دقیقاً مشخص شود. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی نوع، شدت و میزان جراحات بافتی ایجاد شده در اثر عفونت ثانویه با تحت تیپ  $H_9N_2$  ویروس آنفلوانزا متعاقب تلقیح با باکتری ORT در جوجه‌های SPF می‌باشد.

#### مواد و روش کار

##### پرنندگان

شصت قطعه جوجه SPF نژاد لگهورن در سن یک روزگی به صورت تصادفی در سه گروه ۲۰ قطعه‌ای توزیع گردیدند. جوجه‌های هر گروه بصورت جداگانه در داخل ایزولاتورهای دارای فشار مثبت در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی کرج در شرایط کنترل شده نگهداری شدند و آب و دان بطور آزاد در دسترس جوجه‌ها قرار گرفت.

##### شرایط آزمایش

در سن ۲۱ روزگی به تمامی پرنندگان گروه‌های اول و دوم میزان ۰/۵ سی سی حاوی  $1 \times 10^{10}$  CFU باکتری ORT (ORT-R87-7/1387) به روش داخل نای تلقیح شدند و در

داده‌های بدست آمده از جراحات بافتی گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آماری غیرپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis Test) و بسته آماری SPSS ویرایش ۱۸ مورد آنالیز آماری قرار گرفتند و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شدند.

### نتایج

جراحات بافتی اندام‌های مورد مطالعه در گروه‌های مختلف آزمایشی به تفکیک نمونه‌های بافتی به شرح ذیل می‌باشد. در طول بررسی هیچ‌گونه تغییرات آسیب‌شناسی در بافت‌های گروه کنترل دیده نشد.

### نای

گروه اول: در روزهای ۲، ۴ و ۶ پس از تلقیح، علائم از دست دادن مژه‌ها، همراه با کمی ارتشاح تک‌هسته‌ایها در زیر مخاط مشاهده گردید که از روز هشتم نای ترمیم گردید و طبیعی بنظر می‌رسید. گروه دوم: در روزهای ۶ تا ۸ پس از تلقیح، ریزش مژک‌ها همراه با کمی ارتشاح تک‌هسته‌ایها در زیر مخاط نای مشاهده گردید که از روز ۱۰ نای ترمیم گردید، ولی در برخی موارد ترشحات داخل مجرا مشاهده می‌شد (نگاره ۱). براساس مقایسه آماری بین دو گروه آزمایش در روزهای ۸ تا ۱۲ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در نای اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

### ریه

گروه اول: علائم پرخونی و ادم اطراف عروقی همراه با نشت فیبرین و نکروز (پنومونی حاد) با ارتشاح هتروفیل‌ها در روز ۲ بعد از تلقیح دیده شد که نشت فیبرین با نکروز (پنومونی تحت حاد) و ارتشاح لنفوسیت‌ها از روز ۴ تا ۱۲ روز بعد از تلقیح دیده شد. در روزهای ۱۴ و ۱۶ بعد از تلقیح تنها پرخونی و کمی ادم اطراف عروقی وجود داشت.

گروه دوم: پرخونی و ادم اطراف عروقی همراه با نشت فیبرین و نکروز (پنومونی تحت حاد) و ارتشاح لنفوسیت‌ها در روزهای ۶-۱۲ بعد از تلقیح مشاهده شد که بعلاوه در روزهای ۸ و ۱۰ بعد از تلقیح افزایش سلول‌ها در داخل عروق کوچک نیز دیده شد و شدیدترین ضایعات در روز ۱۲ بعد از تلقیح مشاهده گردید، ولی در روزهای ۱۴-۱۶ بعد از تلقیح تنها پرخونی و کمی ادم اطراف عروقی ملاحظه شد (نگاره ۲). بر اساس مقایسه آماری بین دو گروه آزمایش در روزهای ۶ و ۱۴ تا ۱۶ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در ریه اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

### کلیه

گروه اول: از روزهای ۲ تا ۱۰ بعد از تلقیح علائم پرخونی، خونریزی و نکروز لوله‌های ادراری و معدودی کانون‌های ارتشاح تک‌هسته‌ایها ملاحظه گردید که در روز ۱۰ نکروز لوله‌ها گسترده‌تر بود، ولی در روزهای ۱۲ تا ۱۶ شدت ضایعات کاهش یافت و به شکل پرخونی و کانون‌های ارتشاح تک‌هسته‌ایها دیده شد (نگاره ۳). گروه دوم: در روزهای ۶ تا ۱۰ روز بعد از تلقیح پرخونی، خونریزی، نکروز لوله‌های ادراری و کانون ارتشاح تک‌هسته‌ایها مشاهده شد که در روز ۱۲ شدت و گستردگی ضایعات لوله‌های ادراری بیشتر بود. در روزهای ۱۲ تا ۱۶ بعد از تلقیح ضایعات به شکل پرخونی، کمی نکروز و کانون‌های ارتشاح تک‌هسته‌ایها دیده شد. بر اساس مقایسه آماری بین دو گروه آزمایش در روزهای ۶ و ۱۴ تا ۱۶ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در کلیه اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

### کبد

ملاحظه گردید. گروه دوم: در روزهای ۶ تا ۱۶ بعد از تلقیح افزایش تعداد فولیکول های لنفاوی و کمی هیپرپلازی سلولهای رتیکولر ( که از روز ۱۲ شدت بیشتری داشتند) مشاهده گردید. بر اساس مقایسه آماری بین دو گروه آزمایش در روزهای ۶ و ۱۴ تا ۱۶ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در طحال اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

#### تیموس

گروه اول: از روزهای ۲ تا ۱۶ بعد از تلقیح کمی پرخونی در بخش مرکزی همراه با کمی نکروز و ارتشاح خفیف هتروفیل ها ملاحظه گردید. میزان نکروز در روز ۱۰ از شدت و گستردگی بیشتری برخوردار بود. گروه دوم: در روزهای ۶ تا ۱۶ بعد از تلقیح پرخونی همراه با کمی نکروز و ارتشاح خفیف هتروفیل ها در بخش مرکزی دیده شد. بر اساس مقایسه آماری بین دو گروه آزمایش در روزهای ۶ و ۱۴ تا ۱۶ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در تیموس اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

#### لوزه های سکومی

گروه اول: کمی افزایش تعداد فولیکول های لنفاوی در روزهای ۴ تا ۱۶ بعد از تلقیح وجود داشت. گروه دوم: کمی افزایش تعداد فولیکول های لنفاوی در روزهای ۶ تا ۱۶ بعد از تلقیح ملاحظه گردید. بر اساس مقایسه آماری بین دو گروه آزمایش در روزهای ۶ تا ۱۶ بجز روز ۱۲ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در لوزه های سکومی اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

گروه اول: در روزهای ۲ تا ۱۶ بعد از تلقیح عمده ترین ضایعات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در کبد به شکل پرخونی در سینوزوئیدها و سیاهرگ مرکزی و در برخی موارد وجود کانون های ارتشاح تک هسته ایها در پارانشیم کبد و اطراف عروق ملاحظه گردید. گروه دوم: در روزهای ۶ تا ۱۶ بعد از تلقیح پرخونی در سینوزوئیدها و سیاهرگ مرکزی و در برخی موارد وجود کانون های ارتشاح تک هسته ایها در پارانشیم کبد و اطراف عروق مشاهده شد (نگاره ۴) که میزان پرخونی در روز ۱۰ شدیدتر بود. بر اساس مقایسه آماری بین دو گروه آزمایش در روزهای ۶ تا ۱۰ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در کبد اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

#### بورس فابریسیوس

گروه اول: در روزهای ۲ تا ۱۶ بعد از تلقیح کمی تخلیه لنفوسیت های فولیکول های لنفاوی و در مواردی کمی آتروفی فولیکول ها ملاحظه گردید و در روز ۱۰ نیز کمی نکروز لنفوسیت ها دیده شد. گروه دوم: در روزهای ۶ تا ۱۶ بعد از تلقیح کمی تخلیه لنفوسیت های فولیکول های لنفاوی و در مواردی کمی آتروفی فولیکول ها وجود داشت (نگاره ۵). بر اساس مقایسه آماری بین دو گروه آزمایش در روزهای ۶ تا ۸ و ۱۴ تا ۱۶ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در بورس فابریسیوس اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

#### طحال

گروه اول: از روز ۴ تا ۸ بعد از تلقیح افزایش تعداد فولیکول های لنفاوی وجود داشت و در روز ۱۰ علائم نکروز همراه با ارتشاح کمی هتروفیل دیده شد. در روزهای ۱۲ تا ۱۶ بعد از تلقیح علائم هیپرپلازی سلولهای رتیکولر همراه با افزایش تعداد فولیکول های لنفاوی و کمی ارتشاح هتروفیل ها

جدول ۱: نتایج حاصل از مقایسه درجه جراحات آسیب شناسی بافت‌های نای، ریه، کلیه و کبد در سه گروه مورد بررسی

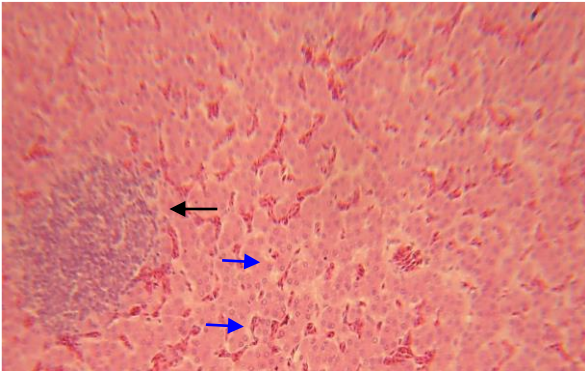
اندام	گروه	روزهای پس از تلقیح							
		۱۶	۱۴	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	
نای	اول	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۳۶ <sup>a</sup>	۱/۲۰±۰/۴۸ <sup>b</sup>	۱/۸۰±۰/۳۱ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۶۴ <sup>b</sup>	۱/۴۰±۰/۱۵ <sup>a</sup>
	دوم	۱/۰۰±۰/۲۰ <sup>a</sup>	۱/۲۰±۰/۳۷ <sup>a</sup>	۱/۶۰±۰/۴۰ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۲۷ <sup>b</sup>	۲/۸۰±۰/۲۴ <sup>c</sup>	۲/۲۰±۰/۴۶ <sup>b</sup>	-	-
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
ریه	اول	۱/۶۰±۰/۵۰ <sup>a</sup>	۲/۰۰±۰/۴۲ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۱۴ <sup>b</sup>	۳/۰۰±۰/۶۵ <sup>b</sup>	۳/۴۰±۰/۶۰ <sup>b</sup>	۳/۲۰±۰/۷۱ <sup>c</sup>	۲/۸۰±۰/۵۶ <sup>b</sup>	۱/۸۰±۰/۳۵ <sup>b</sup>
	دوم	۳/۲۰±۰/۲۷ <sup>b</sup>	۳/۴۰±۰/۴۵ <sup>c</sup>	۳/۰۰±۰/۱۸ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۵۰ <sup>b</sup>	۲/۲۰±۰/۷۲ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۳۲ <sup>b</sup>	-	-
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
کلیه	اول	۲/۲۰±۰/۰۹ <sup>b</sup>	۳/۰۰±۰/۳۴ <sup>b</sup>	۳/۴۰±۰/۴۸ <sup>bc</sup>	۳/۶۰±۰/۴۰ <sup>c</sup>	۳/۲۰±۰/۶۲ <sup>bc</sup>	۲/۶۰±۰/۳۵ <sup>b</sup>	۲/۰۰±۰/۲۶ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۱۵ <sup>a</sup>
	دوم	۳/۴۰±۰/۱۲ <sup>c</sup>	۳/۸۰±۰/۲۵ <sup>c</sup>	۳/۶۰±۰/۴۵ <sup>c</sup>	۳/۰۰±۰/۷۷ <sup>bc</sup>	۲/۶۰±۰/۴۵ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۷۱ <sup>a</sup>	-	-
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
کبد	اول	۱/۴۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۲/۰۰±۰/۲۰ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۲۱ <sup>c</sup>	۲/۲۰±۰/۵۶ <sup>b</sup>	۱/۸۰±۰/۲۷ <sup>b</sup>	۱/۴۰±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۱/۲۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
	دوم	۱/۶۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۱۰ <sup>b</sup>	۱/۸۰±۰/۵۳ <sup>b</sup>	۲/۰۰±۰/۱۹ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۸۷ <sup>a</sup>	۱/۲۰±۰/۳۴ <sup>a</sup>	-	-
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>

a, b, c: نشانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشد. گروه اول: باکتری ORT به تنهایی؛ گروه دوم: عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا؛ گروه سوم: کنترل

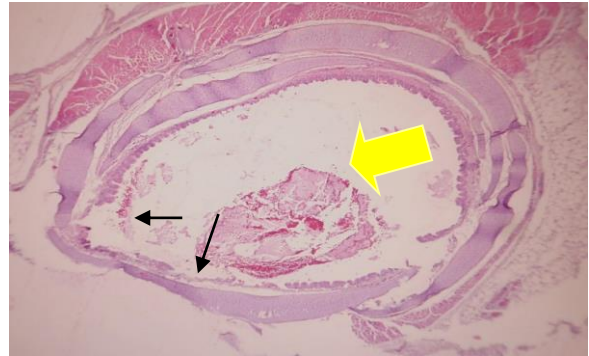
جدول ۲: نتایج حاصل از مقایسه درجه جراحات آسیب شناسی بافت‌های بورس، طحال، تیموس و لوزه سکومی در سه گروه مورد بررسی

اندام	گروه	روزهای پس از تلقیح							
		۱۶	۱۴	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	
بورس	اول	۱/۲۰±۰/۲۰ <sup>a</sup>	۱/۸۰±۰/۲۰ <sup>a</sup>	۲/۶۰±۰/۴۲ <sup>b</sup>	۲/۸۰±۰/۳۶ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۴۸ <sup>c</sup>	۲/۲۰±۰/۴۰ <sup>b</sup>	۲/۰۰±۰/۳۰ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۲۵ <sup>a</sup>
	دوم	۳/۰۰±۰/۱۲ <sup>b</sup>	۳/۲۰±۰/۲۰ <sup>b</sup>	۲/۸۰±۰/۲۰ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۳۱ <sup>b</sup>	۱/۸۰±۰/۶۵ <sup>b</sup>	۱/۲۰±۰/۲۰ <sup>a</sup>	-	-
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
طحال	اول	۱/۲۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۶۰±۰/۱۰ <sup>ab</sup>	۲/۲۰±۰/۶۳ <sup>b</sup>	۲/۴۰±۰/۲۲ <sup>b</sup>	۲/۰۰±۰/۴۲ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۳۲ <sup>b</sup>	۱/۴۰±۰/۱۲ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
	دوم	۳/۴۰±۰/۳۰ <sup>b</sup>	۳/۰۰±۰/۴۲ <sup>c</sup>	۲/۶۰±۰/۲۴ <sup>b</sup>	۱/۸۰±۰/۵۳ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۲۱ <sup>b</sup>	۱/۲۰±۰/۴۴ <sup>a</sup>	-	-
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
تیموس	اول	۱/۴۰±۰/۱۰ <sup>a</sup>	۱/۸۰±۰/۵۲ <sup>ab</sup>	۲/۴۰±۰/۳۸ <sup>b</sup>	۲/۸۰±۰/۶۲ <sup>b</sup>	۲/۴۰±۰/۵۸ <sup>b</sup>	۲/۲۰±۰/۳۰ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۳۱ <sup>b</sup>	۱/۲۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
	دوم	۲/۶۰±۰/۶۰ <sup>b</sup>	۳/۰۰±۰/۳۱ <sup>c</sup>	۲/۶۰±۰/۵۶ <sup>b</sup>	۲/۲۰±۰/۶۷ <sup>b</sup>	۱/۸۰±۰/۳۰ <sup>b</sup>	۱/۲۰±۰/۴۴ <sup>a</sup>	-	-
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>
لوزه‌های سکومی	اول	۱/۲۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۶۰±۰/۱۰ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۲۰ <sup>b</sup>	۲/۸۰±۰/۳۷ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۵۴ <sup>b</sup>	۲/۰۰±۰/۱۲ <sup>b</sup>	۱/۶۰±۰/۳۲ <sup>b</sup>	۱/۲۰±۰/۴۰ <sup>a</sup>
	دوم	۳/۰۰±۰/۲۴ <sup>b</sup>	۲/۸۰±۰/۴۲ <sup>c</sup>	۲/۴۰±۰/۵۲ <sup>b</sup>	۱/۸۰±۰/۲۰ <sup>c</sup>	۱/۴۰±۰/۴۷ <sup>a</sup>	۱/۲۰±۰/۴۰ <sup>a</sup>	-	-
	سوم	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>

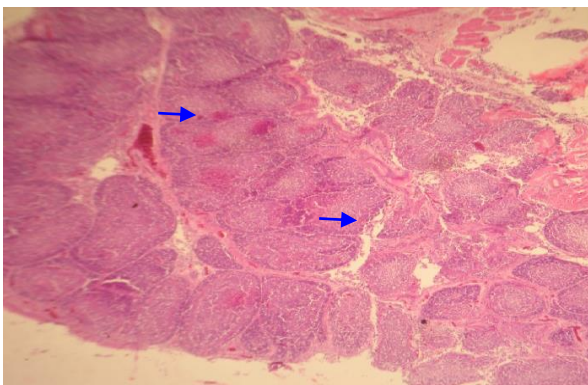
a, b, c: نشانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشد. گروه اول: باکتری ORT به تنهایی؛ گروه دوم: عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا؛ گروه سوم: کنترل



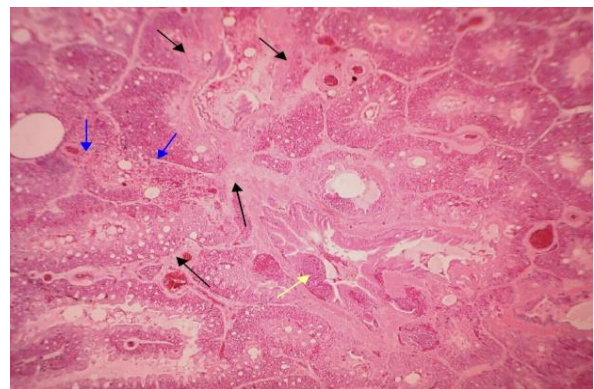
نگاره ۴: کبد جوجه گروه آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا در روز هشتم پس از تلقیح - پرخونی در سینوزوئیدها (فلش های آبی رنگ) و یک کانون نسبتاً بزرگ ارتشاح تک هسته ای در پارانشیم کبد (فلش سیاه رنگ) دیده می شود. (H&E  $\times 50$ ).



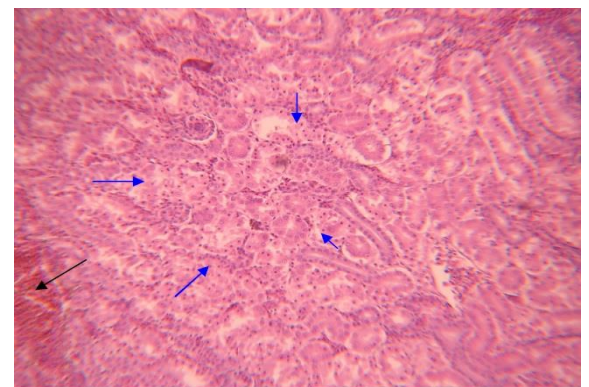
نگاره ۱: نای جوجه گروه آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا در روز هشتم پس از تلقیح - از بین رفتن مژه ها و کنده شدن مخاط (فلش های سیاه) همراه با وجود اکسودا در مجرا (فلش زرد رنگ) دیده می شود (H&E  $\times 100$ ).



نگاره ۵: بورس فابریسیوس جوجه گروه آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا در روز چهاردهم پس از تلقیح - تخلیه لنفوسیت های فولیکول های لنفاوی (فلش های آبی رنگ) دیده می شود. (H&E  $\times 100$ ).



نگاره ۲: ریه جوجه گروه آلودگی ثانویه با ویروس آنفلوانزا در روز هشتم پس از تلقیح - پرخونی و خونریزی (فلش آبی)، ادم (فلش های سیاه) و ارتشاح لنفوسیت ها در زیر مخاط برونش ثانویه (فلش زرد رنگ) دیده می شود (H&E  $\times 200$ ).



نگاره ۳: کلیه جوجه گروه باکتری انفرادی در روز هشتم پس از تلقیح - پرخونی و خونریزی (فلش سیاه) و نکروز لوله های ادراری دیده می شود. (H&E  $\times 200$ ).

### بحث

از بیماریهای باکتریایی مهم در کمپلکس های تنفسی طیور عفونت اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال می باشد (۳) که حضور باکتری ORT با استفاده از روشهای مختلف در طیور صنعتی، بوقلمون و سایر نژاد های ماکیان کشور ردیابی و شناسایی گردیده است (۱). مطالعات انجام شده پیشین نشان می دهد که برخی سویه های باکتری ORT به تنهایی در

جوجه‌های SPF قادر به ایجاد تظاهرات کلینیکی بیماری می‌باشند (۱، ۲) و در صورت ظهور شرایط مستعد کننده نظیر ابتلا به عفونت‌های ثانویه ویروسی و باکتریایی منجر به تشدید بیماریزایی و ضایعات ORT در پرندگان مبتلا می‌شود (۱، ۳، ۸، ۱۱، ۱۴-۱۷). یکی از این عوامل ثانویه مهم ویروس H9N2 آنفلوانزا که در کمپلکس‌های تنفسی طیور گزارش شده است (۵). با این حال مطالعات کاملی از نظر هیستوپاتولوژی روی عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا در جوجه‌های مبتلا به باکتری ORT صورت نگرفته است تا نقش ویروس آنفلوانزا در جراحات بافتی ناشی از باکتری ORT دقیقاً مشخص شود. لذا در مطالعه حاضر اثر تجربی ویروس H9N2 آنفلوانزا بعنوان عامل ثانویه بر جراحات بافتی جوجه‌های SPF مبتلا به باکتری ORT مورد بررسی قرار گرفت.

در یک بررسی بدنبال تلقیح باکتری ORT در جوجه‌های گوشتی ۸ هفته، در نای تراکئیت همراه با پرخونی، ادم، هیپرپلازی بافت پوششی و ارتشاح سلول‌های آماسی و در ریه پنومونی فیبرینی چرکی، پرخونی، نکروز و نفوذ هتروفیل‌ها و سلول‌های تک‌هسته‌ای به همراه تجمع اکسودا در پارابرونشها گزارش شد (۳). طبق یک مطالعه انجام شده جراحات بافتی نای در مرغان تخم‌گذار SPF نژاد لگهورن که بطور همزمان با ویروس برونشیت عفونی و باکتری اش‌ریشیاکلی عفونی شده و در معرض عفونت ثانویه با اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال بودند، در مقایسه با گروه‌های انفرادی برونشیت عفونی، اش‌ریشیاکلی و اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال و همچنین گروه‌های همزمان برونشیت عفونی و اش‌ریشیاکلی و گروه همزمان ویروس برونشیت عفونی و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال به مراتب شدیدتر بود و نکروز و ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای به همراه اکسودای

فیبرینی در زیر مخاط برونش‌های ثانویه و ریه مهم‌ترین ضایعات هیستوپاتولوژیک در گروه‌های همزمان بود (۹). در یک تحقیق با تلقیح داخل نابی جدایه‌های ویروس آنفلوانزای با قدرت بیماریزایی کم (nHPAI) و ویروس فوق حاد (HPAI) به ماکیان نشان داده شد که ویروس‌های nHPAI فقط در نای و ریه جراحات بافتی ایجاد کردند، در حالی‌که ویروس‌های HPAI منجر به جراحات نکروز و التهاب در بورس فابریسیوس، تیموس، طحال، قلب، پانکراس، کلیه، مغز، نای، ریه و عضلات اسکلتی پرندگان عفونی شدند (۱۸). محققین با تزریق سویه‌های ویروس آنفلوانزای با قدرت بیماریزایی کم به جوجه‌های پنج هفته‌ای مشاهده کردند که در پرندگان گروه تزریق داخل نابی به میزان کمتری نسبت به گروه داخل بینی، تراکئیت خفیف تا شدید، برونشیت و پنومونی در اطراف برونش‌های ثانویه وجود داشت (۱۹). در یک مطالعه تجربی با تلقیح ویروس‌های آنفلوانزا و نیوکاسل به جوجه‌ها و بوقلمون‌های SPF گزارش شد که جراحات هیستوپاتولوژیک گروه همزمان نسبت به گروه‌های انفرادی آنفلوانزا و نیوکاسل شدیدتر بود. همچنین این مطالعات نشان داد ضایعات هیستوپاتولوژی گروه همزمان آنفلوانزا و نیوکاسل در بافت‌های پوششی نای، ریه، کلیه و بورس فابریسیوس شدیدتر و طولانی‌مدت بود (۱۳). در مطالعه تجربی دیگر ضایعات هیستوپاتولوژیکی آلودگی همزمان ویروس آنفلوانزای H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال در جوجه‌های SPF بررسی گردید که در جوجه‌های عفونی شده همزمان با ویروس H9N2 و باکتری ORT جراحات هیستوپاتولوژی ناشی از ویروس آنفلوانزا در ارگان‌های دستگاه تنفس و سیستم ایمنی شدید و طولانی‌مدت بود (۱۱). در تحقیقی دیگر نشان داده شد جوجه‌های عفونی با ویروس

همکاران (۲۰۱۴)، Thachil و همکاران (۲۰۰۹) و Azizpour و همکاران (۲۰۱۸)، هم‌خوانی دارد (۹، ۱۱، ۱۳). افزایش شدت ضایعات در نای و ریه گروه عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا نشان دهنده این موضوع است که ویروس آنفلوانزا بعنوان عفونت ثانویه سبب تشدید شدن و طولانی شدن جراحات بافتی ناشی از باکتری ORT شده است.

در یک مطالعه ای به روش ایمنوهیستوشیمی عوارض هیستوپاتولوژیکی ویروس آنفلوانزا ( $H_9N_2$ ) در کلیه شامل نفريت لمفوسیتی بینابینی لوله‌های ادراری در طی روزهای ۱ و ۳ پس از تلقیح گزارش شد (۱۹). در یک مطالعه دیگر نفريت هتروفیلی بینابینی توبولی همراه با نکروز اپی‌تلیوم مجاری در روز ۳ پس از تلقیح با ویروس آنفلوانزا ( $H_9N_2$ ) مشاهده گردید (۱۲). احتقان، نفريت بینابینی کانونی غیرچرکی به همراه نکروز و رسوب اورات در کلیه ها در اثر عفونت همزمان ویروس  $H_9N_2$  با باکتری مایکوپلاسما گالی سیتیکوم نیز گزارش شده است (۱۵). در یک مطالعه تجربی با تلقیح داخل وریدی ویروس‌های nHPAI، جراحات کلیه شامل نکروز شدید لوله‌های ادراری و نهایتاً مرگ و میر جوجه‌های عفونی را گزارش شد (۲۰). مطالعات هیستوپاتولوژیکی و ایمنوهیستوپاتولوژیکی با ویروس‌های nHPAI نشان داد که نکروز توبول‌های کلیوی به ویژه لوله‌های پروگزیمال مرتبط با تکثیر ویروس  $H_9N_2$  وجود داشت (۲۱). در تحقیق دیگر پس از تلقیح داخل وریدی ویروس  $H_9N_2$  به جوجه‌های SPF در کلیه علایمی از قبیل نفريت هتروفیلی چندکانونی بینابینی توبولی و نفريت بینابینی فیبروزه همراه با آتروفی مجاری و ارتشاح کانونی تا منتشر لمفوسیت‌های بینابینی مشاهده گردید (۲۲). در تحقیقی دیگر اثر ویروس آنفلوانزا بصورت تکی و

آنفلوانزای  $H_9N_2$  در صورت ابتلا به آلودگی ثانویه با باکتری ORT منجر به تشدید و طولانی شدن جراحات بافت های مورد بررسی نسبت به گروه انفرادی ویروس  $H_9N_2$  شد (۷). در جوجه های SPF آلوده شده بطور همزمان با باکتری های اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال و آوی باکتریم پاراگالینارم، علایم بالینی به مراتب شدیدتر از گروه های انفرادی اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال و آوی باکتریم پاراگالینارم بود (۱۶). در یک مطالعه تجربی با تلقیح باکتری های ORT و انتروکوکوس فکالیس به صورت جداگانه و همزمان به جوجه های SPF به بررسی بیماریزایی پرداختند و بیان کردند که میزان مرگ و میر گروه همزمان ORT و انتروکوکوس فکالیس نسبت به عفونتهای انفرادی و یا آلودگی های ثانویه شدیدتر بود، همچنین این مطالعه نشان داد جراحات کالبدگشایی ناشی از گروه همزمان ORT و انتروکوکوس فکالیس و گروه آلودگی اولیه با ORT و عفونت ثانویه با انتروکوکوس فکالیس شدیدتر بصورت پنومونی هموراژیک شدید، تورم کسیه های هوایی و نای هموراژیک بود، درحالیکه گروه ORT به تنهایی پنومونی هموراژیک معمولی، تورم کسیه های هوایی و نفريت هموراژیک داشت (۱۷).

در این تحقیق در گروه‌های عفونی ریزش مژک‌ها، پرخونی و هیپرپلازی مخاط همراه با ارتشاح تک هسته‌ایها در زیر مخاط نای و خونریزی، ادم، پنومونی همراه با ارتشاح تک هسته‌ایها و هتروفیل‌ها در زیر مخاط برنش‌های ثانویه ریه مشاهده گردید که در گروه عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا نسبت به گروه ORT به تنهایی با شدت بیشتر و سیر طولانی‌تری تا بهبودی همراه بود. یافته‌های مطالعه حاضر در خصوص جراحات نای و ریه گروه عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا با گزارشات Costa-Hurtado و



H9N2 گزارش شده است. طبق گزارشات پیشین، طحال بیشترین تغییرات هیستوپاتولوژیک را در بین بافت‌های لمفوئیدی داشت که شامل هیپرپلازی سلول‌های رتیکلواندوتلیال و یا افزایش تعداد فولیکول‌های لمفاوی در روزهای ۳ و ۱۰ پس از تلقیح ویروس H9N2 و هیپرپلازی ملایم تا متوسط سلول‌های رتیکلواندوتلیال و افزایش تعداد فولیکول‌های لمفوئیدی در روزهای ۱ و ۱۱ پس از تلقیح ویروس H9N2 بود (۱۹). در جوجه‌های مبتلا به عفونت همزمان مایکوپلازما گالی سپتیکوم (MG) و ویروس H9N2، تخلیه لمفوسیتی ملایم تا متوسط، آتروفی فولیکول‌های لمفوئیدی و ادم بین فولیکولی در بورس فابریسیوس و احتقان شدید، تخلیه لمفوسیتی و نکروز کانونی در کورتکس به ویژه سلول‌های رتیکلواپیتلیال و میوسیت‌ها در مدولای لوب‌های تیموس مشاهده شد (۲۴).

#### نتیجه‌گیری و پیشنهادات

در مطالعه حاضر در جوجه‌های گروه باکتری ORT علاوه بر ایجاد جراحات بافتی در ارگان‌های تنفسی، کبد و کلیه‌ها، در طحال، بورس فابریسیوس، تیموس و لوزه‌ها سکومی نیز جراحات بافتی مشاهده شد که تاکنون در این ارگان‌ها در اثر آلودگی با باکتری ORT به تنهایی ضایعه‌ی بافتی مشخصی بیان نشده بود. همچنین جراحات ایجاد شده در بافت کبد و کلیه‌ها و بافت‌های لنفوئیدی در جوجه‌های گروه عفونت ثانویه با H9N2 ویروس آنفلوانزا نسبت به گروه ORT به تنهایی شدیدتر بود و ضایعات پاتولوژیک مدت زمان بیشتری ادامه داشت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد آلودگی ثانویه با ویروس H9N2 آنفلوانزا در جوجه‌های مبتلا به ORT، علاوه بر ایجاد جراحات بیشتر و طولانی‌تر در ارگان‌های تنفسی و کبد سبب بروز تغییرات

آلودگی همزمان با برونشیت عفونی، اورنیتوباکتریم رینوتراکتال و اشریشیاکلی بررسی شد که مشخص گردید ویروس آنفلوانزا به تنهایی، فقط قادر به تکثیر و ایجاد ضایعات در سیستم تنفسی است، اما در گروه‌های همزمان به غیر از نای و ریه‌ها در سایر بافت‌ها نظیر کلیه و بورس فابریسیوس جراحاتی ایجاد کرد (۲۳). در مطالعه حاضر نیز پرخونی و خونریزی و نکروز لوله‌های ادراری همراه با ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ایها در گروه‌های مبتلا مشاهده گردید که این جراحات در گروه عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا نسبت به گروه ORT تکی با شدت بیشتری همراه بود. این موضوع نشان دهنده‌ی طولانی و شدید بودن جراحات بافت کلیه در گروه عفونت ثانویه با ویروس آنفلوانزا است که این یافته با نتایج Pazani و همکاران (۲۰۰۸)، Bano و همکاران (۲۰۰۳)، Costa-Hurtado و همکاران (۲۰۱۴)، Thachil و همکاران (۲۰۰۹) همسو می‌باشد (۹، ۱۳، ۲۳، ۲۴).

در یک عفونت تجربی با باکتری ORT در جوجه‌های گوشتی دژنرسانس و نکروز انعقادی در بافت کبد جوجه تلف شده دیده شد (۳). طبق مطالعه دیگر در گروه‌های همزمان برونشیت عفونی و اورنیتوباکتریم رینوتراکتال و همچنین برونشیت عفونی، اورنیتوباکتریم رینوتراکتال و اشریشیاکلی در کبد ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای و رسوب فیبرین در اطراف ورید مرکزی و در طحال تخلیه لنفاوی و رسوب فیبرین وجود داشت (۹). آتروفی لمفوئیدی و فولیکول‌های کیستیک در بورس فابریسیوس (۱۲، ۱۹)، تخلیه لمفوسیتی در بخش قشری بافت تیموس در روزهای ۱ و ۱۰ پس از تلقیح (۱۹) و روزهای ۶ و ۱۱ پس از تلقیح و حضور نوکلئوپروتئین ویروس در لوزه‌های سکومی در روز ۳ پس از تلقیح (۱۹) در آلودگی با ویروس

- Veterinary Microbiology. 2016; 12 (2): 23-33.
7. Goudarzi H, Azizpour A, Charkhkar S, Hablolvarid M, Momayez R. Experimental study of histopathological lesions induced by ornithobacterium rhinotracheale infection followed inoculation with H9N2 avian influenza virus. *Journal of Comparative Pathobiology*. 2016; 12(4) : 1783-1792.
  8. Pan Q, Liu A, Zhang F, Ling Y, Ou C, Hou N, et al. Co-infection of broilers with *Ornithobacterium rhinotracheale* and H9N2 avian influenza virus. *BMC veterinary research*. 2012;8(1):1-7.
  9. Thachil A, Velayudhan BT, Shaw DP, Halvorson DA, Nagaraja KV. Pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* in egg-laying hens with coexisting infectious bronchitis virus and *Escherichia coli* infections. *Journal of Applied Poultry Research*. 2009;18(4):780-8.
  10. Azizpour A, Goudarzi H, Charkhkar S, Momayez R, Hablolvarid M. Experimental study on tissue tropism and dissemination of H9N2 avian influenza virus and *Ornithobacterium rhinotracheale* co-infection in SPF chickens. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 2014;24(6): 1662-1655.
  11. Azizpour A, Goudarzi H, Charkhkar S, Momayez R, Hablolvarid M, Bijanzad P. An experimental study of histopathological lesions caused by H9N2 subtype of avian influenza virus and *Ornithobacterium rhinotracheale* co-infection. *Journal of Veterinary Research*. 2018;73(2): 199-207.
  12. Hablolvarid MH, Sohraby Haghdoost I, Pourbakhsh S, Gholami M. A study on histopathologic changes in chicken following intravenous inoculation with avian influenza virus A/Chicken/Iran/259/1998 (H9N2). *Archives of Razi Institute*. 2003; 55(1): 41-54.
  13. Costa-Hurtado M, Afonso CL, Miller PJ, Spackman E, Kapczynski DR, Swayne DE,

بافتی شدیدتر و طولانی مدت در کلیه‌ها، طحال، بورس فابریسیوس، تیموس و لوزه‌ها سکومی نیز می‌گردد.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله وظیفه خود می‌دانند که از آقایان دکتر حسین گودرزی، دکتر منصور بنانی و دکتر محمد حسن حبل‌الورید اساتید ارجمند موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج به خاطر مساعدت در اجرای این تحقیق، کمال تشکر و قدردانی نمایند.

#### فهرست منابع

1. Chin RR, Van Empel PCM, Hafez HM. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Swayne DE (Ed.). *Disease of Poultry*, 13th edition: Wiley-Blackwell: Ames, NJ, USA. 2013: 807–858.
2. Goudarzi H, Azizpour A, Banani M, Nouri A, Seifi S. Survey of tissue tropism and dissemination of ORT-R87-7/1387 strain of *Ornithobacterium rhinotracheale* in SPF chickens. *Veterinary Researches & Biological Products*. 2015;28(2):2-8.
3. Banani M, Khaki P, Goudarzi H, Yousefi J, Pourbakhsh S. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a broiler and a pullet flock. *Pajouhesh-va-Sazandegi*. 2000; 46: 106-109.
4. Van Empel P, Hafez H. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian pathology*. 1999;28(3):217-27.
5. Banani M, Momayez R, Pourbakhsh S, Goudarzi H, Bahmani Nejad MA. Simultaneous isolation of *O. rhinotracheale* and avian influenza virus subtype H9N2 from commercial poultry chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2002; 6: 190-195.
6. Azizpour A, Goudarzi H, Nouri A, Seifi S, Bijanzad P. A study of experimental infection with *Ornithobacterium rhinotracheale* on pathogenesis of avian influenza virus H9N2 subtype. *Journal of*

- pathogenic avian influenza virus and lentogenic Newcastle disease virus in experimental co-infections in chickens and turkeys. *Veterinary research*. 2014;45(1):1-11.
14. Swayne DE, Suarez LS, Sims LD. Avian influenza. In: Swayne DE (Ed.). *Disease of poultry*, 13th edn: Wiley-Blackwell: Ames, USA. 2013: 181–218.
  15. Chu J, Zhang Q, Zuo Z, El-Ashram S, Guo Y, Zhao P, et al. Co-infection of *Chlamydia psittaci* with H9N2, ORT and *Aspergillus fumigatus* contributes to severe pneumonia and high mortality in SPF chickens. *Scientific reports*. 2017;7(1):13997.
  16. Morales-Erasto V, Falconi-Agapito F, Luna-Galaz G, Saravia L, Montalvan-Avalos A, Soriano-Vargas E E, et al. Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens from Peru. *Avian Diseases*. 2016;60(1):75-78.
  17. Zhao P, Wu G, Zhang Q, Chu J, Xie C, Wang Y, et al. Experimental Investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Enterococcus faecalis* Co-Infection in Chickens. *Pakistan Veterinary Journal*. 2015;35 (2): 173-177.
  18. Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE. Comparative Pathology of Chickens Experimentally Inoculated with Avian Influenza Viruses of Low and High Pathogenicity. *Avian Diseases*. 1997;41(1):125-36.
  19. Pourbakhsh SA, Sohraby Haghdoost I, Hablolvarid MH, Gholami MR. Histopathological Study of Intratracheally Inoculated A/Chicken/Iran/259/1998 (H9N2) Influenza Virus in Chicken. *Archives of Razi Institute*. 2004;58(1):51-62.
  - et al. Virus interference between H7N2 low
  20. Swayne DE, Slemmons RD. Renal Pathology in Specific-Pathogen-Free Chickens Inoculated with a Waterfowl-Origin Type A Influenza Virus. *Avian Diseases*. 1990;34(2):285-94.
  21. Slemmons RD, Swayne DE. Replication of a Waterfowl-Origin Influenza Virus in the Kidney and Intestine of Chickens. *Avian Diseases*. 1990;34(2):277-84.
  22. Swayne DE, Slemmons RD. Comparative Pathology of a Chicken-origin and Two Duck-origin Influenza Virus Isolates in Chickens: The Effect of Route of Inoculation. *Veterinary Pathology*. 1994;31(2):237-45.
  23. Bano S, Naeem K, Malik SA, editors. Evaluation of Pathogenic Potential of Avian Influenza Virus Serotype H9N2 in Chickens. *Avian diseases*; 2003 ; 2003; 47(3 Suppl): 817-822.
  24. Pazani J, Marandi MV, Ashrafihelan J, Marjanmehr SH, Ghods F. Pathological studies of A/Chicken/Tehran/ZMT-173/99 (H9N2) influenza virus in commercial broiler chickens of Iran. *International Journal of Poultry Science*. 2008;7(5):502-10.

