

“Research article”

DOI: 10.30495/JVCP.2021.1928578.1304

The effect of garlic (*Allium sativum*) and red onion (*Allium cepa*) on the histopathological signs of avian influenza disease in broiler chickens exposed to avian influenza virus subtype H₉N₂

Rajabi, Z.^{1*}, Shahbazfar, A.A.², Haghparast kisami, S.³

1- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

3- D.V.M. Graduate, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding author's email: rajabi@tabrizu.ac.ir

(Received: 2021/4/25 Accepted: 2021/8/23)

Abstract

Avian Influenza (AI) virus subtype H₉N₂ is endemic in Iran and reported from all over the world. It causes economic losses to the poultry industry. In this study the role of garlic (*Allium sativum*) and red onion (*Allium cepa*) in reducing the severity of the histopathological signs of the avian influenza disease caused by subtype H₉N₂ in broiler chickens was evaluated. Toxicity of garlic and onion was evaluated first, and then the treatment groups consisting of 72 one day old Ross broiler chicks divided into 9 treatment groups were challenged with the H₉N₂ virus at 28 days. After one day, the challenged groups received garlic and red onion with feed for seven days. During the study, antibody titers against the H₉N₂ virus, clinical signs, and histopathological samples were recorded. The garlic and onion had no toxic effect on chickens. In histopathology, the percentage of goblet cells and villus diameter was statistically higher in negative control and treatment groups compared to the positive control group ($p < 0.05$). It seems the garlic and red onion reduced the severity of the histopathological signs of the AI disease caused by subtype H₉N₂ in the duodenum of the broiler chickens. They are likely to play a role in repairing intestinal mucosa, by reducing the number of the viruses.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Chickens, Garlic, Histopathology, Influenza, Onion.

تاثیر سیر (*Allium sativum*) و پیاز قرمز (*Allium cepa*) بر نشانه‌های آسیب‌شناختی بیماری آنفلوآنزای پرندگان در جوجه‌های گوشتی مواجهه‌یافته با ویروس آنفلوآنزای

تحت تیپ H9N2

ذوالفقار رجبی^{۱*}، امیرعلی شهبازفر^۲، صادق حق پرست کیسی^۳

۱-دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲-دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳-دانش آموخته دکترای حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: rajabi@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۲/۵ // پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۱

چکیده

ویروس آنفلوآنزای پرندگان، تحت تیپ H9N2 در ایران شیوع بالایی داشته و از سراسر جهان هم گزارش شده است. وقوع بیماری آنفلوآنزا باعث خسارت سنگین اقتصادی در صنعت طیور می‌شود. در مطالعه حاضر نقش سیر (*Allium sativum*) و پیاز قرمز (*Allium cepa*) در کاهش شدت نشانه‌های آسیب‌شناختی بیماری آنفلوآنزای پرندگان ناشی از تحت تیپ H9N2 در جوجه‌های گوشتی، بررسی شد. بدین منظور ابتدا سمیت سیر و پیاز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تعداد ۷۲ قطعه جوجه یک روزه نژاد گوشتی سویه راس به ۹ گروه ۸ قطعه‌ای تقسیم شدند که شامل ۴ گروه درمانی، ۱ گروه کنترل مثبت و ۴ گروه مسمومیت بودند. سپس گروه‌های درمانی در ۲۸ روزگی با ویروس مواجهه داده شدند. پرندگان گروه‌های مواجهه داده شده یک روز بعد از مواجهه به مدت هفت روز، به‌طور جداگانه سیر و پیاز قرمز را همراه غذا دریافت کردند. در ادامه علائم بالینی، نشانه‌های آسیب‌شناختی و نیز تیترا آنتی‌بادی اختصاصی ضد ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 در سرم پرندگان مورد آزمایش بررسی شد. سیر و پیاز هیچ اثر سمی بر جوجه‌ها نداشتند. در آسیب‌شناسی روده نیز میزان افزایش سلول‌های جامی شکل و قطر پرزها در گروه‌های کنترل منفی و درمانی در مقایسه با گروه کنترل مثبت، بیشتر بود که از نظر آماری نیز اختلاف معنی‌دار داشتند ($p < 0/05$). به نظر می‌رسد سیر و پیاز قرمز که موجب کاهش شدت علائم آسیب‌شناختی بیماری آنفلوآنزای پرندگان ناشی از تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوآنزا در دئودنوم جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه شدند، احتمالاً با کاهش تعداد ویروس‌ها، در ترمیم مخاط روده نقش دارند.

کلیدواژه‌ها: آنفلوآنزای پرندگان، جوجه گوشتی، پیاز، سیر، آسیب‌شناسی.

مقدمه

Shalini *et al.*, 2017) اشاره کرد. همچنین مطالعات

نشان می‌دهد، سیر و پیاز دارای ترکیبات متعدد با خواص گوناگون درمانی از جمله اثرات ضدویروسی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و تعدیل‌کننده واکنش‌های سیستم ایمنی می‌باشند. در این خصوص گزارش شده که ترکیب لکتین ویژه مانوز (mannose-specific lectin) موجود در سیر با اتصال به ترکیب گلیکانی ساختار پوشش خارجی عامل بیماری ایدز، مانع ورود ویروس به داخل سلول می‌شود (Balzarini, 2006). در این راستا، ساتیو و همکاران در سال ۲۰۱۴، نشان دادند که عصاره گیاه آویشن دارای خاصیت ضدویروسی علیه هرپس ویروس‌ها می‌باشد (Santoyo *et al.*, 2014). همچنین کریمی و همکاران در سال ۲۰۱۴، نشان دادند، عصاره اتانولی گیاه اکیناسه و عصاره آبی گیاه اولدربری سیاه، اثرات ضدویروسی علیه تحت‌تیپ‌های H₁, H₂, H₃, H₅ و H₇ ویروس آنفلوآنزای تیپ A و نیز ویروس آنفلوآنزای تیپ B دارند (Karimi *et al.*, 2014). احمد و همکاران در سال ۲۰۱۷، نشان دادند عصاره سیر بر ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ اثر ضد ویروسی دارد (Ahmed *et al.*, 2017). همچنین در مطالعه‌ای که توسط احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد، مشخص کردند که پیاز قرمز و زرد در شرایط آزمایشگاهی و خارج از بدن، خاصیت ضد ویروس آنفلوآنزا تحت تیپ H₉N₂ را دارند ولی اثرات ضد ویروسی پیاز قرمز نسبت به پیاز زرد بیشتر است (Ahmadi *et al.*, 2018). بر این اساس به نظر می‌رسد که استفاده از غذاهایی مانند سیر و پیاز که خواص ضدویروسی و ضدباکتریایی دارند (Faramarzi and Khaki, 2015)، برای کاهش شدت بیماری

بیماری آنفلوآنزای پرندگان ناشی از تحت تیپ H₉N₂ ویروس آنفلوآنزا در ایران (Vasfi and Bozorg, 2002; Nili and Asasi, 2003) و جهان (Al-Garib *et al.*, 2016) شیوع بالایی دارد. این بیماری علاوه بر اهمیت اقتصادی از نظر بهداشت عمومی نیز مهم بوده و رعایت اصول بهداشتی و واکسیناسیون در کنترل آن نقش اساسی دارد (Khan *et al.*, 2015). با این وجود، بیماری شایع بوده و ویروس عامل آن مقاومت دارویی نشان می‌دهد (Aghahosseini *et al.*, 2012). گزارش‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً شناسایی و استفاده از ترکیبات ضد آنفلوآنزای جدید همراه غذا بتواند در کنار روش‌های ذکرشده، در کنترل بهتر بیماری فوق موثر باشد (Karimi *et al.*, 2014; Santoyo *et al.*, 2014).

سیر (*Allium sativum*) و پیاز قرمز (*Allium cepa*)، سبزیجاتی با خاصیت‌های دارویی هستند که هزاران سال است در غذای انسان‌ها جایگاه ویژه خودشان را پیدا کرده‌اند و بخشی از غذای ما شده‌اند. این مواد با داشتن ترکیبات سولفور و غیرسولفور، خواص منحصر به فردی دارند که از جمله می‌توان به خواص پادزیستی، ضد فشار خون و کاهش کلسترول، کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی (Jaiswal and Rizvi, 2014; Brull *et al.*, 2015; Sobenin *et al.*, 2016)، هیپولیپیدمی و ضدترومبوتیکی (Kavalcova *et al.*, 2014)، آنتی‌اکسیدانی (Lee *et al.*, 2014; Housseini and Hosseinzadeh, 2015; Mollavali *et al.*, 2016)، همچنین تقویت فعالیت‌های سیستم ایمنی بدن، خواص ضد درد و ضدالتهابی (Wainright *et al.*, 1991) و فعالیت‌های پروبیوتیکی (Noda and Kawaoka, 2010) را

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر در موسسه تحقیقاتی خلعت‌پوشان و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز در سال ۱۳۹۸ انجام گرفت.

- نحوه تکثیر دادن تحت تیپ H₉N₂ ویروس آنفلوانزای پرندگان و تعیین عیار آن: به منظور تکثیر ویروس استاندارد آنفلوانزای پرندگان {101(101)/98(H₉N₂)-A/Chicken/Iran/ZMT} تهیه شده از گروه بهداشت و بیماری‌های طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تعدادی تخم مرغ جنین‌دار از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال غرب کشور تهیه شد. ۱۰ روز بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷/۵ درجه سلسیوس در دستگاه جوجه‌کشی (مدل SAM600، شرکت سامنو، ایران)، ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت ۰/۰۱ ویروس آنفلوانزای استاندارد فوق، داخل کیسه آلانتویک تخم مرغ‌های مذکور تلقیح و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰ درصد به مدت ۶ روز در دستگاه جوجه‌کشی (مدل SAM600، شرکت سامنو، ایران)، نگه‌داری شد. بعد از تلقیح، هر روز عمل کندلینگ در مورد آن‌ها انجام می‌گرفت. مرگ جنینی در تخم مرغ‌ها، پس از ۲۴ ساعت اول بعد از تلقیح، آلودگی میکروبی محسوب شده و حذف می‌گردیدند. اما تخم مرغ‌هایی که بعد از ۲۴ ساعت اول، دچار مرگ جنینی شده بودند به مدت یک روز در یخچال (مدل SND9680ED، شرکت بلومبرگ، ترکیه) ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شده و سپس مایع آلانتویک از آن‌ها استحصال شده و عیار ویروس‌های تکثیر یافته با استفاده از آزمایش هم‌آگلوتیناسیون (hemagglutination assay; HA) مشخص می‌گردید. ویروس‌های استحصال شده تا

آنفلوانزا مناسب باشند، چراکه این بیماری هم خودش بطور مستقیم باعث بروز علائم می‌شود و هم زمینه را برای عفونت‌های ثانویه باکتریایی فراهم می‌کند (Swayne *et al.*, 2019). در مطالعات انجام شده خواص ضد ویروسی سیر و پیاز را به حضور ترکیبات حاوی سولفور و مواد غیرسولفور در این سبزیجات نسبت می‌دهند (Bayan *et al.*, 2014). برخی از ترکیبات سولفور مثل آلین‌متیل تیوسولفینات دارای فعالیت ضد ویروسی هستند و علیه ویروس‌های مختلف عمل می‌کنند. این خاصیت ضد ویروسی آن‌ها احتمالاً به دلیل ممانعت از جذب یا نفوذ برخی ویروس‌ها است و از جمله ویروس‌های حساس، سایتومگالو ویروس انسانی، ویروس آنفلوانزای تیپ B، تیپ‌های ۱ و ۲ هرپس سیمپلکس ویروس، ویروس پاراآنفلوانزای تیپ ۳، واکسینا ویروس و تیپ ۳ راینو ویروس انسانی می‌باشند (Wang *et al.*, 2016).

لذا با توجه به اثرات ضد ویروسی سیر و پیاز و برخی خواص دیگر مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد ترومبوزی ذکر شده در مورد آن‌ها که سبب درمان علامتی عوارض ناشی از بیماری آنفلوانزا می‌شود و همچنین با توجه به اینکه ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H₉N₂، بیماری‌زایی پایینی دارد و معمولاً بدن‌بال عفونت‌های ثانویه علائم بیماری حاصله از آن تشدید می‌شود (Fathihafshanjani, 2013; Swayne *et al.*, 2019)، در مطالعه تجربی حاضر، تاثیر سیر و پیاز در تعدیل نشانه‌های آسیب‌شناختی بیماری آنفلوانزا در جوجه‌های گوشتی مبتلا به ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ مورد بررسی قرار گرفت.

مرگ می‌شدند، استحصال‌گردیده و جهت تایید حضور ویروس مورد نظر، آزمایش HA بر روی آن‌ها انجام می‌گرفت. لازم به ذکر است که در روز ششم، تخم‌مرغ‌هایی که جنین آن‌ها هنوز زنده مانده بودند، یک روز در یخچال ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا مرگ جنینی رخ دهد و پس از استحصال مایع آلتوتوئیک آن‌ها، آزمایش HA روی آن‌ها نیز انجام گرفت. در نهایت میزان EID50 با استفاده از فرمول زیر، محاسبه گردید (Villegas, 2008).

$$EID50 = x + d/2 - d \sum ri/n$$

x: بالاترین رقتی است که آزمایش شده است؛

d: فاصله مابین دزهای متوالی بصورت لگاریتمی (فاکتور رقت)؛

$\sum ri$: تعداد کل نمونه‌های غیر عفونی؛

n: تعداد نمونه‌های بکارگرفته‌شده در هر سطح رقت است.

- تهیه گلبول قرمز ۱ درصد ماکیان: ابتدا سدیم سیترات (شرکت مرک، آلمان) با غلظت ۳/۲ درصد به‌عنوان ضد انعقاد تهیه شد، سپس با سرنگ ۲ میلی‌لیتر دارای ضد انعقاد فوق از ورید بالی ماکیان خون اخذ شد، به‌طوری‌که نسبت ضد انعقاد به خون ۱ به ۹ شد. خون اخذشده با دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (شرکت دی تجهیز آریان پایا، مدل T24، ایران) شد، بعد از سانتریفیوژ، پلاسما بالایی سلول‌های قرمز خون با سمپلر (مارک برنند، انگلیس) خارج شد و ۴ برابر حجم سلول‌های قرمز خون PBS (شرکت مرک، آلمان) به لوله آزمایش اضافه شد، بعد از مخلوط سلول‌های قرمز خون و PBS دوباره همانند توضیحات فوق سانتریفیوژ و مایع بالایی آن با سمپلر خارج شد. شستشو با PBS دو بار دیگر تکرار شد. در نهایت با توجه به

زمان مطالعه در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس (مدل AV039M، شرکت کالتیس، تایوان) نگه‌داری می‌شدند (Woolcock, 2008).

- نحوه تعیین میانگین دز عفونی (mean embryo infectious dose at 50%; EID50) ویروس مورد آزمایش تکثیرشده: برای این کار از روش اسپرمن-کاربر استفاده شد. بدین منظور ابتدا از مایع آلتوتوئیک استحصال‌شده در مراحل قبل، در داخل لوله‌های آزمایش ۲۰ میلی‌لیتر استریل، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه گردید. برای این کار، در درون ۱۰ عدد لوله آزمایش، بطور جداگانه، ۹ میلی‌لیتر محلول استریل فسفات بافر سالین (phosphate buffered saline; PBS) (شرکت مرک، آلمان) ریخته می‌شد. در ادامه به لوله اول، ۱ میلی‌لیتر از مایع آلتوتوئیک حاوی ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ که در مرحله قبل تکثیر داده شده بودند، اضافه شده و پس از مخلوط کردن، ۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصله را برداشته و به لوله دوم انتقال می‌دادیم. این عمل تا لوله دهم ادامه می‌یافت. در ادامه از محتویات رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-10} تهیه شده در مرحله قبل، در حفره آلتوتوئیک ۳ عدد تخم مرغ جنین‌دار ۷ روزه که به روش مشابه گرمخانه‌گذاری شده بودند، تلقیح می‌گردید. سپس تخم مرغ‌ها در داخل گرمخانه (مدل SAM600، شرکت سام‌نو، ایران) و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ روز قرار داده شده و هر روز عمل کندلینگ در مورد آن‌ها انجام می‌گرفت. در این مرحله هم مرگ جنینی در تخم مرغ‌ها، پس از ۲۴ ساعت اول بعد از تلقیح، آلودگی میکروبی محسوب شده و حذف می‌گردیدند و مایع آلتوتوئیک تخم مرغ‌هایی که جنین آن‌ها در روزهای بعد، دچار

- نحوه انجام آزمایش HI (hemagglutination inhibition) به منظور تعیین تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی ضد ویروس آنفلوانزا: ابتدا سرم نمونه‌های خون مورد آزمایش با ساتریفیوژ (شرکت دی تجهیز آریان پایا، مدل T24، ایران) با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا می‌شدند. سپس جهت انجام آزمایش HI برای هر نمونه سرم، جداگانه در تمام گوده‌های یک ردیف از میکروپلیت ۹۶ خانه U شکل (شرکت کارتل، ایتالیا)، ۵۰ میکرولیتر PBS (شرکت مرک، آلمان) ریخته می‌شد. سپس در گوده اول به میزان ۵۰ میکرولیتر از سرم مورد نظر را ریخته و بعد از مخلوط کردن PBS با سرم، به میزان ۵۰ میکرولیتر از محتویات گوده اول برداشته شده و در گوده دوم ریخته می‌شد. پس از مخلوط کردن محتویات گوده دوم، دوباره به همان میزان از گوده دوم برداشته و به گوده سوم انتقال می‌یافت. رقیق‌سازی سرم مورد آزمایش، به همین نحو تا گوده آخر ادامه می‌یافت و در نهایت از محتویات گوده آخر ۵۰ میکرولیتر خارج گردیده و دور ریخته می‌شد. در مرحله بعد در تمام گوده‌ها ۵۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ۴ واحدی ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H₉N₂ که در مرحله قبل تهیه شده بود، ریخته می‌شد. سپس به مدت ۳۰ الی ۴۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه این مخلوط‌ها، نگهداری می‌شدند. پس از این مدت به تمام گوده‌ها ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز ۱ درصد ماکیان اضافه می‌گردید. در این مرحله مجدداً به مدت ۳۰ الی ۴۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، مخلوط‌های فوق نگهداری شدند. سپس تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی ضد ویروس آنفلوانزای مورد نظر در تحقیق حاضر، در سرم جوجه‌های مورد آزمایش در کنار گوده‌های شاهد (PBS

حجم سلول‌های قرمز خون، PBS به آن اضافه شد تا سلول‌های قرمز ۱ درصد تهیه شود (Killian, 2008).
- نحوه تعیین عیار ویروس‌های تکثیرشده: بدین منظور از آزمایش هم‌آگلوتیناسیون استفاده شد. در طی این آزمایش ابتدا ۵۰ میکرولیتر از محلول PBS (شرکت مرک، آلمان) به هر گوده میکروپلیت ۹۶ گوده‌ای U شکل (شرکت کارتل، ایتالیا)، به‌طور جداگانه ریخته می‌شد. سپس در گوده اول ۵۰ میکرولیتر از مایع آلتوتویک به عنوان نمونه مورد آزمایش اضافه شد. بعد از مخلوط کردن کامل محلول PBS با مایع آلتوتویک در گوده اول، ۵۰ میکرولیتر از گوده اول برداشته و در گوده دوم ریخته و مخلوط شد. این کار به همین صورت تا گوده ۱۲ ادامه یافت. سپس ۵۰ میکرولیتر از گوده ۱۲ برداشته و دور ریخته شد. در ادامه کار به تمام گوده‌ها ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز ۱ درصد خروس اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه گرماگذاری و سپس نتیجه قرائت شد (Killian, 2008).

- تهیه آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا با عیار ۴ واحد HA: بدین منظور ابتدا برای تعیین اولیه تیتراژ آنتی‌ژن هم‌آگلوتینین، ۵ میلی‌لیتر از محلول PBS (شرکت مرک، آلمان) به یک ویال از آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزای تحت-تیپ H₉N₂ (شرکت پسونک، ایران) ریخته شد. سپس عیار آنتی‌ژن با آزمایش هم‌آگلوتیناسیون مشخص گردید. در ادامه با توجه به عیار HA بدست آمده، آنتی‌ژن فوق به اندازه‌ای با PBS رقیق شد که بتواند در آزمایش هم‌آگلوتیناسیون روتین، سلول‌های قرمز خون یک درصد ماکیان را در دو گوده اول آگلوتینه کند (Killian, 2008).

قرمز ایلخچی) روی جوجه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور در مورد ۴ گروه مسمومیت، از ۲۱ روزگی تا ۲۷ روزگی، به غذای دو گروه به ترتیب ۴ و ۲ درصد (به ترتیب ۲۰۲/۵ گرم و ۱۰۱/۲ گرم) غذای مصرفی، سیر کامل پوست‌کنده و خردشده و به دو گروه دیگر به ترتیب ۴ و ۲ درصد (به ترتیب ۲۲۵ گرم و ۱۱۲/۵ گرم) پیاز قرمز کامل پوست‌کنده و خردشده اضافه می‌شد (Alagawany, 2019). با توجه به این‌که گروه‌های درمانی هنوز با ویروس چالش داده نشده بودند، یک گروه از آن‌ها به‌عنوان شاهد منفی گروه مسمومیت در نظر گرفته شد و از پرندگان گروه مذکور برای مطالعه آسیب‌شناختی، نمونه‌ای بافتی تهیه نگردید. در ادامه و در ۲۷ روزگی، از هر گروه مسمومیت، ۵ قطعه پرنده بطور تصادفی انتخاب و ذبح شده و نمونه‌های بافتی از کلیه، کبد، ریه، نای، دئودنوم، پانکراس، طحال و قلب اخذ گردید تا جهت انجام مطالعات آسیب‌شناختی بافتی، استفاده شوند. در ۲۸ روزگی، پرندگان ۴ گروه درمانی و نیز گروه کنترل مثبت با ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ مواجهه داده شدند. بدین منظور یک قطره از ویروس تکثیر داده‌شده (نحوه تکثیر در بالا توضیح داده شده است) به داخل چشم و یک قطره دیگر داخل بینی پرندگان مورد نظر چکانده شد که مجموع دو قطره معادل ۰/۰۸ میلی‌لیتر بود (Nili and Assisi, 2002; Tavakkoli, et al., 2011). یک روز بعد از مواجهه، به مدت ۷ روز به غذای دو گروه درمانی، به ترتیب ۴ و ۲ درصد غذای مصرفی سیر و به دو گروه درمانی دیگر به ترتیب ۴ و ۲ درصد غذای مصرفی پیاز قرمز (مشابه گروه‌های مسمومیت) اضافه شد. ۷ روز بعد، از هر گروه (شامل گروه‌های درمانی، کنترل مثبت و

به همراه آنتی‌ژن ۴ واحدی ویروس آنفلوآنزا تحت تیپ H₉N₂ و گلوبول قرمز ۱ درصد ماکیان) قرائت می‌گردید (Killian, 2008). لازم به ذکر است که تیتراژ آنتی‌بادی علیه تحت تیپ H₉N₂ ویروس آنفلوآنزا در هر نمونه سرم مورد آزمایش، با روش HI تعیین شده و در نهایت میانگین تیتراژ نمونه‌های سرمی گزارش می‌گردید.

- تعیین میانگین تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی ضد ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H₉N₂ در سرم پرندگان گروه‌های مورد مطالعه به روش HI: برای این منظور از ۷ روزگی تا ۲۸ روزگی از ورید بالی ۲۰ قطعه از جوجه‌های مورد مطالعه در گروه‌های مختلف به‌صورت هفتگی و در ۳۵ روزگی (یک هفته بعد از مواجهه) از ۲۰ قطعه از جوجه‌های مواجهه داده‌شده و همه جوجه‌های گروه کنترل منفی (مواجهه داده‌نشده) خون اخذ می‌شد. بعد از جداسازی سرم‌ها، به روش HI تیتراژ آنتی‌بادی آنها مشخص و میانگین آنها محاسبه و یادداشت می‌شد.

- طرح مطالعه: در مطالعه حاضر، تعداد ۷۲ قطعه جوجه‌ی یک روزه نژاد گوشتی سویه راس از کارخانه جوجه‌کشی پرستو (تعاونی ۷۳، استان آذربایجان شرقی) خریداری شد. جوجه‌ها در قفس بطور کاملاً تصادفی به ۹ گروه ۸ قطعه‌ای تقسیم شدند که شامل ۴ گروه درمانی، یک گروه کنترل مثبت و ۴ گروه مسمومیت (از ۲۸ روزگی به بعد، ۸ قطعه از جوجه‌های گروه مسمومیت، در سالن مجاور به‌عنوان گروه کنترل منفی گروه‌های درمانی پرورش داده شد) بودند. بعد از مراقبت سرولوژیک هفتگی و از بین رفتن ایمنی مادری (Talat et al., 2020) با انجام آزمایش هم‌آگلوتیناسیون (Killian, 2008)، ابتدا اثر توکسیک سیر و پیاز قرمز (هر دو، محصول بومی ایران بودند، سیر مازندران و پیاز

آغشته شدند. پس از خروج نمونه‌ها از دستگاه پروسس بافتی، از آنها قالب‌های پارافینی تهیه گردید. سپس قالب‌ها برای سفت شدن در داخل یخچال (مدل SND9680ED، شرکت بلومبرگ، ترکیه) قرار داده شدند. بعد از یک شب نمونه‌ها از یخچال خارج شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم (مدل MICRO DS 4055، شرکت دید سبز، ایران) از آنها، برش‌های ۵ میکرونی تهیه گردید. در ادامه برش‌ها به روی لام (شرکت سیل برند، چین) منتقل شده و پس از خشک شدن، با استفاده از محلول‌های رنگی همتاکسیلین و اتوزین (شرکت مرک، آلمان) رنگ‌آمیزی شدند. در ادامه جهت محافظت از لام‌های تهیه شده، بر روی آنها لامل (شرکت منزل-گلستر، انگلیس) چسبانده می‌شد. پس از خشک شدن چسب لامل‌ها، نمونه‌های بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری (مدل YS100، شرکت نیکون، ژاپن) و با درشت‌نمایی‌های ۴۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ بررسی شده و نتایج آسیب‌شناختی مربوطه، یادداشت می‌گردید. لازم به ذکر است که برای بررسی طول و قطرپررها، تعداد ۱۰ زمینه میکروسکوپی و در هر زمینه، تعداد ۳ پرز با لنز مدرج بررسی می‌گردید (De Verdal, et al., 2010). همچنین شدت علائم آسیب‌شناختی در بافت‌های مورد بررسی هم به شرح جدول ۱ نمره‌گذاری کمی شدند (Landmann, et al., 2021).

منفی) ۵ قطعه پرنده بطور تصادفی انتخاب و ذبح شده و از کلیه، کبد، ریه، نای، دئودنوم، پانکراس، طحال و قلب، نمونه‌های بافتی برای مطالعات آسیب‌شناختی تهیه گردید. لازم به ذکر است که در طول مطالعه، نشانه‌های بالینی مشاهده شده، ثبت می‌شد. همچنین برای اطمینان از مواجهه صحیح جوجه‌ها با ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H₉N₂ و عدم آلودگی گروه کنترل منفی در طول مطالعه، تیتراژ آنتی‌بادی علیه ویروس مذکور با آزمایش مهار هماگلوتیناسیون (HI) بررسی می‌شد.

- آماده‌سازی مقاطع آسیب‌شناختی: نمونه‌های اخذ شده مربوط به بافت‌های کلیه، کبد، ریه، نای، دئودنوم، پانکراس، طحال و قلب، بلافاصله به درون ظروف پلاستیکی حاوی فرمالین ۱۰ درصد (شرکت مرک، آلمان) منتقل می‌گردید. فرمالین نمونه‌ها، بعد از ۲۴ ساعت اول تعویض می‌شد. پس از گذشت سه هفته و پایدارشدن، نمونه‌ها به دستگاه اتوماتیک پروسس بافتی (مدل DS 2080/H، شرکت دید سبز، ایران) منتقل شده و به مدت ۱۸ ساعت در محلول‌های مختلف الکل (شرکت پارس الکل، ایران) با خلوص متفاوت صعودی شامل الکل ۷۰ درصد، الکل ۸۰ درصد، الکل ۹۶ درصد و در نهایت الکل مطلق و محلول گزیلول (شرکت مرک، آلمان) و الکل و پارافین قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها با پارافین (شرکت آرمان سینا، ایران) گرم

جدول ۱- نمره‌گذاری کمی ضایعات و عارضه‌های آسیب‌شناختی در بافت‌های نای، ریه، کبد، روده و قلب

بافت مطالعه شده	درجه‌بندی ضایعات آسیب-			
	صفر	+۱	+۲	+۳
نای	عارضه‌ندار	حضور پراکنده سلول‌های آماسی	حضور لایه پیوسته نازک از سلول‌های آماسی	حضور لایه پیوسته قطور از سلول‌های آماسی
ریه	عارضه ندارد	پرخونی و آماس پراکنده تک هسته‌ای با کمتر از یک کانون در هر میدان میکروسکوپی با درشت‌نمایی ۴۰۰	پرخونی و آماس پراکنده تک هسته‌ای با بین ۳-۱ کانون در هر میدان میکروسکوپی با درشت‌نمایی ۴۰۰	پرخونی و آماس پیوسته تک هسته‌ای با حضور سلول‌های لنفوسیت به صورت منتشر
کبد	عارضه ندارد	پرخونی ملایم	پرخونی متوسط	پرخونی و حضور پراکنده سلول‌های آماسی
روده	عارضه ندارد	التهاب تک هسته‌ای ملایم	التهاب تک هسته‌ای متوسط	التهاب تک هسته‌ای متوسط با تخریب ملایم پرزهای روده
قلب	عارضه ندارد	حضور پراکنده سلول‌های آماسی به مقدار کم	حضور پراکنده سلول‌های آماسی به مقدار زیاد	حضور پراکنده سلول‌های آماسی به همراه دژنراسانس میوسیت‌ها

- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های مربوط به درصد سلول‌های جامی شکل، طول و قطر پرزهای روده به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و روش تکمیلی دانکن (Duncan)، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ تحلیل شدند. سطح معنی‌داری اختلافات آماری، $p \leq 0/05$ لحاظ گردید. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نمایش داده‌شد.

یافته‌ها

عیار هماگلوآنتی‌ناسیون ویروس تکثیر داده شده ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ (H₉N₂) که جهت چالش جوجه‌ها مورد استفاده قرار گرفت، معادل

^{۲۷} و میزان EID₅₀ ویروس مذکور هم معادل $10^{6.72}$ در هر میلی‌لیتر به دست آمد.

- علائم بالینی مشاهده شده در پرندگان مورد آزمایش: قبل از مواجهه، در گروه‌ها علائمی مشاهده نشد. در روز دوم بعد از مواجهه، در همه پرندگان گروه‌های مواجهه داده شده در گروه‌های مختلف درمانی، افزایش ترشحات چشم، آبریزش از بینی، کسالت و افسردگی، تنگی نفس و کاهش اشتها، به مدت ۲ روز به وضوح مشاهده و بعد، از شدت علائم، به ویژه میزان کسالت و کم‌اشتهایی، کاسته شد در حالی که در گروه کنترل مثبت، شدت بروز نشانه‌های فوق تا ۳ روز ادامه یافت و بعد، از شدت علائم کاسته شد.

- تیر آنتی‌بادی اختصاصی ضد ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 در سرم پرندگان گروه‌های مورد مطالعه: میانگین تیر آنتی‌بادی مهار هماگلوتیناسیون مورد نظر، در ۷، ۱۴ و ۲۱ روزگی به ترتیب، ۴/۶۲، ۲/۷۴ و ۱/۶۳ شد. قبل از چالش (۲۸ روزگی) ۱/۰۴ و بعد از چالش (۳۵ روزگی) ۵ محاسبه شد. همچنین تیر آنتی‌بادی مذکور در گروه شاهد منفی در طول مطالعه صفر ماند.

- نتایج آسیب‌شناختی بافتی در نمونه‌های بافتی پرندگان گروه‌های مسمومیت با سیر و پیاز: در نمونه‌های بافتی پرندگان گروه‌های مسمومیت با سیر و پیاز، کمیت‌های مربوط به میانگین طول پرزهای روده، میانگین قطر پرزهای روده و میانگین درصد سلول‌های جامی شکل در مقاطع آسیب‌شناختی روده اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۲) که مشخص گردید، طول پرزها، در نمونه‌های بافتی گروه‌های مذکور اختلاف آماری معنی‌داری نداشت ($p=0/075$). همچنین بین قطر پرزها در گروه‌های مسمومیت با پیاز ۲ درصد و مسمومیت با سیر ۲ درصد هم اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت، ولی بین دو گروه مذکور و سایر گروه‌ها،

اختلاف معنی‌دار بود ($p=0/001$). از طرف دیگر، میانگین قطر پرزهای روده پرندگان گروه‌هایی که پیاز و سیر ۴ درصد دریافت کرده‌بودند، بیشتر از گروه شاهد بود که این اختلاف هم از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p\leq 0/005$). اختلاف در درصد سلول‌های جامی شکل روده، در بین پرندگان گروه‌های مسمومیت با پیاز ۲ درصد و مسمومیت با سیر ۲ درصد، معنی‌دار نبود ولی بین گروه‌های اخیر و سایر گروه‌ها از این نظر، اختلاف آماری مشاهده شده، معنی‌دار بود ($p=0/001$).

لازم به ذکر است که در گروه مسمومیت پیاز ۲ درصد، عارضه خاصی در دیگر نمونه‌های بافتی مشاهده نشد. در گروه مسمومیت با پیاز ۴ درصد هم، عارضه خاصی بجز کمی التهاب قابل چشم‌پوشی در برخی بافت‌ها همچون روده مشاهده نشد. در گروه مسمومیت با سیر ۲ درصد نیز تنها کمی پرخونی مشاهده شد و بجز آن ضایعه خاصی دیده نشد. همچنین در گروه مسمومیت با سیر ۴ درصد، عارضه خاصی در نمونه‌های بافتی مشاهده نشد.

جدول ۲- کمیت‌های آسیب‌شناختی قسمت دئودنوم روده در گروه‌های مسمومیت (میانگین \pm خطای استاندارد)

گروه	فراسنجه	طول پرزهای روده (میکرومتر)	قطر پرزهای روده (میکرومتر)	درصد سلول‌های جامی شکل
مسمومیت با پیاز ۲ درصد	$50/522/02 \pm$	$95/17 \pm 0/32^a$	$18/4 \pm 50/43^a$	
مسمومیت با پیاز ۴ درصد	$632/53 \pm 50/77$	$0/165/80^b \pm$	$33/6 \pm 25/24^b$	
مسمومیت با سیر ۲ درصد	$575/64 \pm 0/55$	$117/50 \pm 25/00^a$	$23/5 \pm 25/38^a$	
مسمومیت با سیر ۴ درصد	$643/74 \pm 75/65$	$183/34 \pm 75/00^b$	$35/4 \pm 50/20^b$	
سطح معنی‌داری	۰/۰۷۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	

a و b: در هر ستون حروف غیرمشترک، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$).

- نتایج آسیب‌شناختی در نمونه‌های بافتی پرندگان گروه‌های مورد مطالعه: در نمونه‌های بافتی پرندگان

گروه‌های مورد مطالعه، کمیت‌های مربوط به میانگین طول پرزهای روده، میانگین قطر پرزهای روده و

گروه کنترل مثبت و دو گروه درمانی سیر ۲ و ۴ درصد اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ($p=0/008$). در مورد طول پرزها و درصد سلول‌های جامی شکل، کمترین داده مربوط به نمونه‌های پرندگان کنترل مثبت و سپس کنترل منفی بود و با افزایش درصد سیر و پیاز، کمیت‌ها افزایش پیدا کردند. در مورد قطر پرزها نیز کمیت‌ها به ترتیب در نمونه‌های پرندگان گروه کنترل منفی، گروه‌های درمانی سیر و پیاز ۲ درصد، گروه کنترل مثبت و گروه‌های درمانی سیر و پیاز ۴ درصد، افزایش یافت، که تفاوت‌های مشاهده‌ی مذکور، از لحاظ آماری معنی‌دار بودند ($p \leq 0/05$).

میانگین درصد سلول‌های جامی شکل در مقاطع آسیب‌شناختی روده اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۳). مشخص گردید، طول پرزها در بین نمونه‌های بافتی گروه‌های مذکور، اختلاف آماری معنی‌داری نداشت ($p=0/065$). همچنین تفاوت قطر پرزها در بین گروه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت و نیز گروه‌های درمانی پیاز و سیر ۲ درصد معنی‌دار نبود ولی بین گروه‌های اخیر و دو گروه درمانی پیاز و سیر ۴ درصد، اختلاف آماری معنی‌دار بود ($p=0/012$). در خصوص درصد سلول‌های جامی شکل بین دو گروه کنترل مثبت و منفی و گروه درمانی پیاز ۴ درصد و همچنین بین

جدول ۳- کمیت‌های آسیب‌شناسی قسمت دئودنوم روده در گروه‌های درمانی و کنترل‌های مثبت و منفی (میانگین \pm خطای استاندارد)

گروه	فراسنجه	طول پرزهای روده (میکرومتر)	قطر پرزهای روده (میکرومتر)	درصد سلول‌های جامی شکل
کنترل منفی	۵۲۱/۵۴ \pm ۲۵/۵۲	۹۷/۱۷ \pm ۵/۰۸ ^a	۱۸/۲ \pm ۷۵/۹۹ ^{ab}	
کنترل مثبت	۴۹۲/۵ \pm ۵۶/۷۹	۱۰۳/۷ \pm ۷۵/۵۰ ^a	۱۴/۳ \pm ۰/۱۶ ^a	
درمانی با پیاز ۲ درصد	۵۳۳/۷۵ \pm ۸۳/۴۰	۱۰۰/۲۳ \pm ۰/۴۵ ^a	۱۹/۳ \pm ۲۵/۵۹ ^{abc}	
درمانی با پیاز ۴ درصد	۶۴۵/۰ \pm ۹۸/۸۳	۱۵۸/۳۷ \pm ۷۵/۵۰ ^b	۲۵/۴ \pm ۰/۰۸ ^c	
درمانی با سیر ۲ درصد	۵۳۳/۵ \pm ۷۷/۱۹	۱۰۰/۱۸ \pm ۷۵/۹۹ ^a	۲۵/۴ \pm ۰/۱۰ ^{bc}	
درمانی با سیر ۴ درصد	۶۴۵ \pm ۱۱۰/۹۰	۵۰ \pm ۱۵۷/۲۹ ^b	۲۳/۱ \pm ۰/۸۳ ^{bc}	
سطح معنی‌داری	۰/۰۶۵	۰/۰۱۲	۰/۰۰۸	

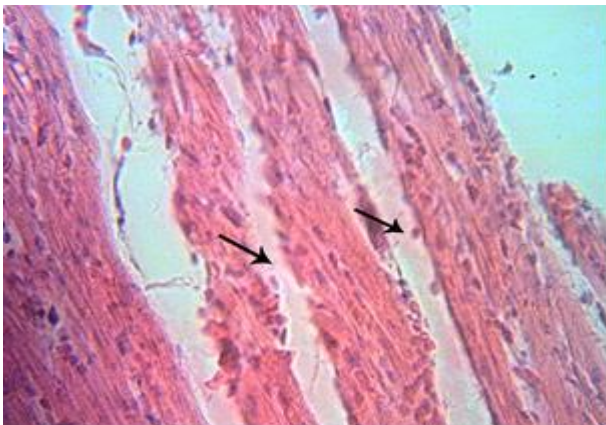
a, b, c: در هر ستون حروف غیرمشترک، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$).

جدول ۴- نمره‌گذاری کمی ضایعات در بافت‌های گروه‌های درمانی و کنترل‌های منفی و مثبت

بافت	کنترل منفی	کنترل مثبت	درمانی با پیاز ۲ درصد	درمانی با پیاز ۴ درصد	درمانی با سیر ۲ درصد	درمانی با سیر ۴ درصد
نای	۰	+۱	+۲	+۱	+۲	+۱
ریه	۰	+۱	+۱	+۲	+۲	+۲
کبد	+۱	+۱	+۱	+۱	+۲	+۱
روده	۰	+۳	+۲	+۱	+۲	+۱
قلب	۰	+۳	+۱	۰	+۱	۰

را نشان می‌دهند و شکل‌های ۴ تا ۸ نیز ضایعات موجود در بافت‌های ریه و نای پرندگان گروه‌های درمانی را نشان می‌دهند.

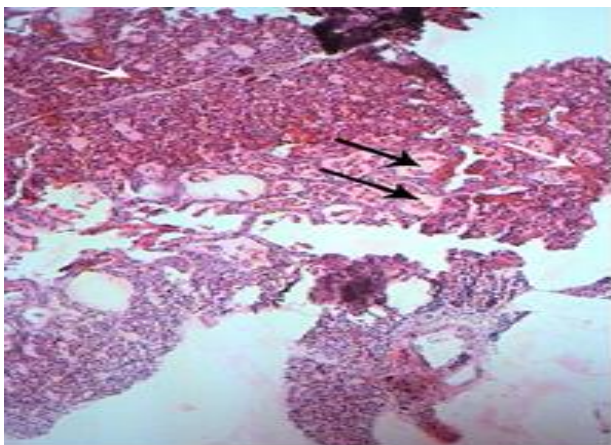
یافته‌های کمی ضایعات موجود در بافت‌های نای، ریه، کبد، روده و قلب پرندگان گروه‌های درمانی و کنترل‌های مثبت و منفی هم به شرح زیر بود (جدول ۴).
شکل‌های ۱ تا ۳ ضایعات مختلف موجود در بافت‌های نای، روده و قلب پرندگان گروه کنترل مثبت



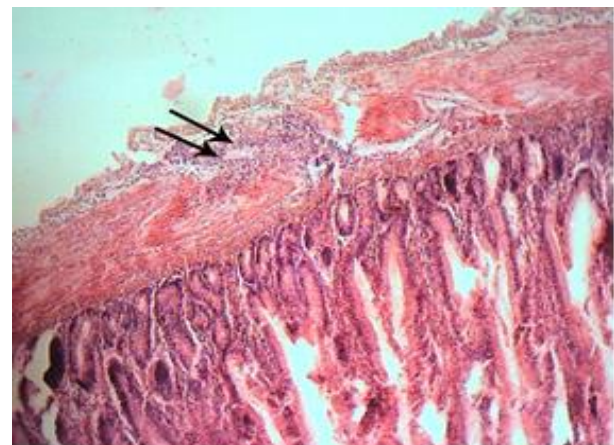
شکل ۳- ادم و آتروفی ماهیچه قلبی (پیکان‌های سیاه) در پرندگان گروه کنترل مثبت را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۸۰۰ برابر).



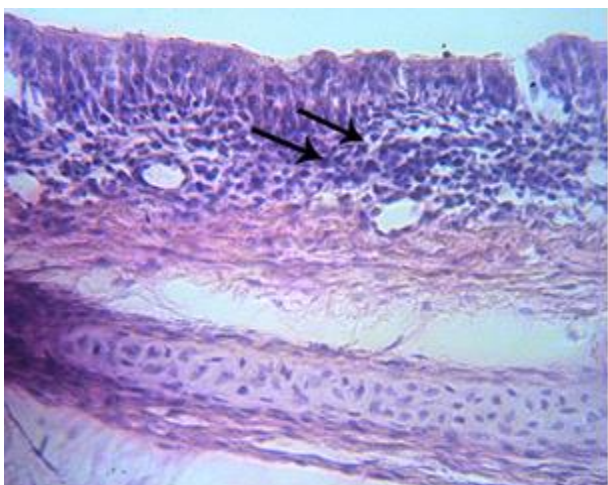
شکل ۱- التهاب شدید تک هسته‌ای (پیکان‌های سیاه) در بافت نای پرندگان گروه کنترل مثبت را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۲۰۰×).



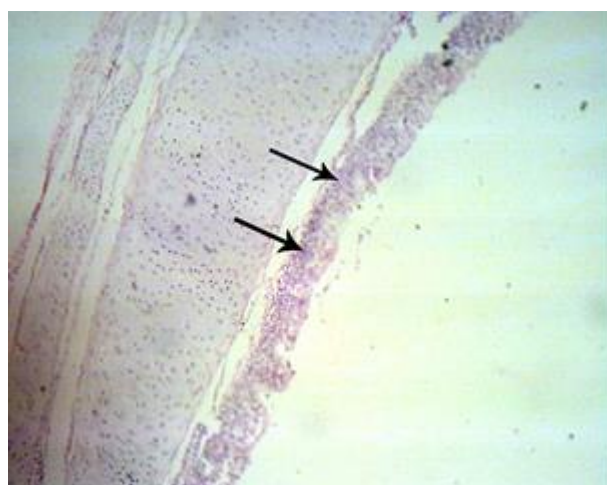
شکل ۴- ادم (پیکان‌های سیاه) و خونریزی ریوی (پیکان‌های سفید) در نمونه بافتی پرندگان گروه درمانی با پیاز ۲ درصد را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۲۰۰×).



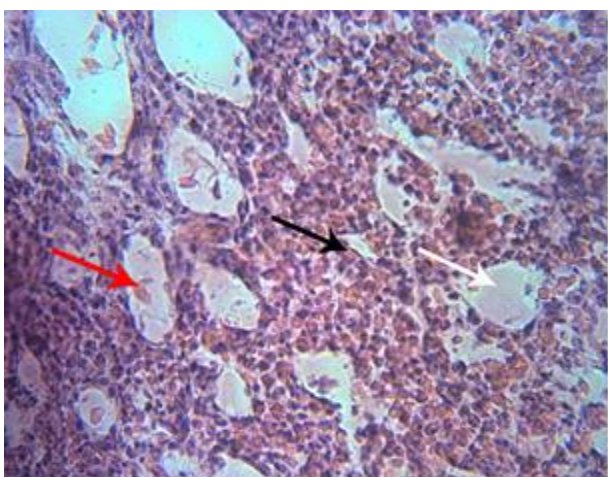
شکل ۲- التهاب تک هسته‌ای (پیکان‌های سیاه) در بافت روده پرندگان گروه کنترل مثبت را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۲۰۰×).



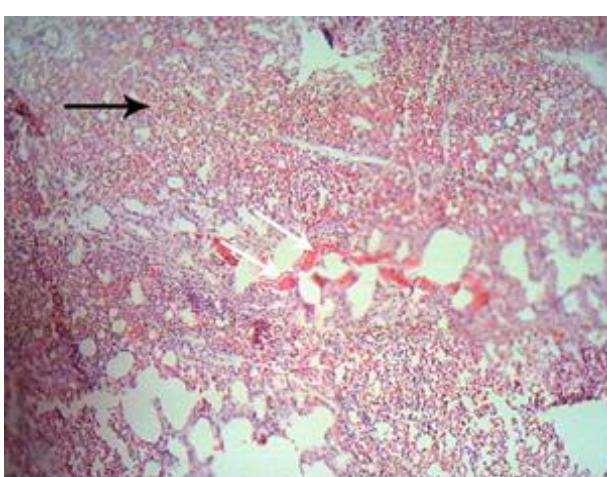
شکل ۷- حضور سلول‌های آماسی (پیکان‌های سیاه)، در پارین نای پرندگان گروه درمانی با سیر ۴ درصد را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی $\times 800$).



شکل ۵- در مقطع بافت نای پرندگان گروه درمانی با پیاز ۲ درصد، التهاب تک هسته‌ای (پیکان‌های سیاه) را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی $\times 200$).



شکل ۸- پرخونی شدید (پیکان سیاه)، ادم (پیکان سفید) و خونریزی ملایم (پیکان قرمز) در بافت ریه پرندگان گروه درمانی سیر ۲ درصد را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی $\times 800$).



شکل ۶- در بافت ریه پرندگان گروه درمانی با پیاز ۴ درصد، حضور سلول‌های التهابی (پیکان سیاه) همراه با پرخونی (پیکان‌های سفید) دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی $\times 200$).

از حیوانات دیگر سمی است (Milewski and Khan, 2006). از اینرو در ابتدای مطالعه حاضر به بررسی اثرات سمی احتمالی سیر و پیاز قرمز پرداخته‌شد که نتایج مطالعهٔ آسیب‌شناختی بافت‌های مختلف نشان داد، سیر و پیاز نه تنها تأثیر منفی بر بافت‌ها ندارند، بلکه با

بحث و نتیجه‌گیری

طبق نتایج بررسی حاضر مقدار پیاز و سیری که به جیره جوجه‌ها اضافه‌شد، مسمومیت‌زا نیست (جدول ۲). در این ارتباط، بعضی از مطالعات نشان می‌دهند که پیاز برای سگ‌ها، گربه‌ها، خوکچه‌های هندی و بسیاری

بود (جدول ۴). نتایج مطالعه آسیب‌شناختی دئودنوم در گروه‌های درمانی هم جالب توجه است. بررسی میانگین طول پرزها در گروه‌های مختلف درمانی نشان می‌دهد، علی‌رغم نبود اختلاف آماری معنی‌دار، کمترین میانگین طول پرزها متعلق به جوجه‌های گروه کنترل مثبت بوده و بیشترین طول پرز هم متعلق به پرندگان گروه‌های درمانی پیاز و سیر ۴ درصد می‌باشد (جدول ۳) که این یافته‌ها بیانگر این نکته است که ویروس در این مطالعه تجربی باعث کاهش طول پرزها در گروه کنترل مثبت شده، در حالی که در پرندگان گروه‌های درمانی پیاز و سیر علی‌رغم مواجهه با ویروس، میانگین طول پرزهای قسمت دئودنوم حتی بهتر از گروه کنترل منفی بوده، بطوری‌که با افزایش درصد سیر و پیاز در جیره غذایی، میانگین طول پرزها افزایش نسبی داشته‌است (جدول ۳). بررسی سایر پارامترهای اندازه‌گیری شده شامل درصد میانگین سلول‌های جامی شکل و قطر پرزها نیز نشان می‌دهد ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ در پرندگان گروه کنترل مثبت، بطور قابل توجهی باعث کاهش درصد سلول‌های جامی شکل شده در حالی که در سایر گروه‌های درمانی چالش داده شده نه تنها این تاثیر منفی مشاهده نمی‌شود بلکه در مقایسه با گروه کنترل منفی، قطر پرزها و درصد سلول‌های جامی شکل در بافت روده جوجه‌های گروه‌های درمانی سیر و پیاز بویژه دو گروه درمانی سیر و پیاز ۴ درصد افزایش معنی‌داری داشته‌است (جدول ۳).

از طرف دیگر با توجه به یافته‌های آسیب‌شناختی بافت دئودنوم پرندگان گروه‌های مسمومیت و گروه‌های درمانی در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد علاوه بر

تاثیر مثبت بر قسمت دئودنوم روده، موجب افزایش سطح مقطع تماس مواد غذایی با روده و افزایش درصد سلول‌های جامی شکل می‌شوند (جدول ۲)، که این امر، باعث افزایش هضم و جذب مواد غذایی می‌گردد (Khonsary, 2017). همچنین یافته‌های مذکور نشان می‌دهد که افزایش درصد سیر و پیاز در جیره غذایی پرندگان مورد آزمایش، بطور معنی‌داری باعث افزایش قطر پرزها و درصد سلول‌های جامی شکل می‌شود و روی طول پرزها هم تاثیر مثبت دارد (جدول ۲). در این خصوص، به نظر می‌رسد که خاصیت ضدباکتریایی سیر و پیاز باعث اصلاح فلور میکروبی روده (Noda and Kawaoka, 2010) و متعاقب آن تاثیر مثبت بر مخاط دئودنوم می‌شود که البته اثبات دقیق این امر، نیاز به مطالعه‌ای جداگانه دارد.

همچنین مطالعه بافت‌های مختلف پرندگان مورد آزمایش هم نشان داد که در جوجه‌های آلوده‌شده به ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ که به همراه جیره غذایی، پیاز قرمز و سیر با درصد‌های مختلف دریافت کردند، در مقایسه با جوجه‌های گروه کنترل مثبت که به جیره غذایی آن‌ها پیاز قرمز و سیر اضافه نشد، شدت نشانه‌های بالینی از جمله کسالت و کم‌اشتهایی یک روز زودتر کاهش یافته، ولی شدت نشانه‌های آسیب‌شناختی در بافت‌های مختلف بویژه در مخاط روده گروه درمانی پیاز ۴ درصد کاهش چشمگیری داشته است، به طوری‌که در گروه درمانی اخیر شدت کمی ضایعات آسیب‌شناختی در بافت‌های نای، ریه، کبد، قلب، صفر و روده +۱ بود، در حالی که در گروه کنترل مثبت شدت کمی ضایعات در بافت‌های نای، ریه و کبد، +۱ و در بافت‌های روده و قلب، +۳

آنفلوآنزا و اثراتی که آنفلوآنزا به وسیله تولید واسطه‌های التهابی دارد، موثر باشد. گزارش شده که ترکیب سولفورهِ سیر یعنی آلیسین، با واکنش با گروه تیول آنزیم‌های مختلف همانند الکل دهیدروژناز (alcohol dehydrogenase) و RNA پلی‌مراز (RNA polymerase) خاصیت ضد میکروبی آن را باعث می‌شود (Hossemi *et al.*, 2017). با توجه به نتایج مطالعات ذکر شده، احتمالاً علت ترمیم مخاط روده در پرندگان گروه‌های درمانی تحقیق حاضر، خواص ضد ویروسی سیر و پیاز باشد و در عین حال با توجه به نتایج آسیب‌شناسی قسمت دئودنوم روده در گروه‌های مسمومیت به نظر می‌سد خواص ضد باکتریایی سیر و پیاز نیز با کنترل تعداد فلور میکروبی روده به ترمیم بافت مخاط روده کمک کرده است (Ramirez, *et al.*, 2020). همچنین در مورد کاهش جزئی نشانه‌های بالینی در مطالعه حاضر هم احتمالاً عامل اصلی خواص آنتی‌اکسیدانی سیر و پیاز (Balzarini, 2006) باشد که باعث تعدیل واکنش‌های التهابی و کاهش علائم بالینی می‌شود (Wainright *et al.*, 1991). در واقع به نظر می‌رسد که بیشتر بودن خاصیت ضد آنفلوآنزایی پیاز قرمز (Ahmadi *et al.*, 2018) و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد ترمبوزی سیر و پیاز قرمز (Balzarini, 2006) در کاهش نشانه‌های آسیب‌شناسی ناشی از ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H_9N_2 نقش داشته باشد. اما یافته‌های مربوط به نمونه‌های آسیب‌شناختی بافت‌های کبد، ریه و نای پرندگان گروه‌های درمانی، ضایعات ناشی از چالش ویروس همانند گروه کنترل مثبت بوده و باعث کاهش شدت علائم نشده بود (شکل‌های ۴ تا ۸)، که احتمالاً علت آن مقدار کم سیر و پیاز مورد استفاده در مطالعه

خاصیت ضد باکتریایی سیر و پیاز (Noda and Kawaoka, 2010)، خاصیت ضد ویروسی آن‌ها (Ahmed *et al.*, 2017; Ahmadi *et al.*, 2018) نیز، احتمالاً باعث کاهش تعداد ویروس‌ها در روده و کاهش تخریب مخاط روده شده است. همچنین در مورد اثرات ضد باکتریایی سیر و پیاز نیز اثبات شده (Noda and Kawaoka, 2010)، که این خاصیت در کنترل شدت بیماری آنفلوآنزا و جلوگیری از درگیری ثانویه باکتریایی موثر است. از طرف دیگر، متیل‌آلیل‌تری-سولفید که در سیر و پیاز یافت می‌شود دارای خاصیت ضد ترومبوزی می‌باشد که این خاصیت می‌تواند با اثر ایسکمی ناشی از ترومبوز عروقی ناشی از ویروس آنفلوآنزا مقابله کند (Pinto and Lamb, 2006). به نظر می‌رسد با توجه به فعالیت تخریبی ویروس آنفلوآنزا اثرات آنتی (Swayne and pantin-jackwood, 2008) اکسیدانی سیر و پیاز در مقابله با آسیب‌های این ویروس نیز موثر می‌باشد. پیاز فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارد. سیر نیز دارای ترکیبات ارگانوگوگرد محلول در آب، مانند اس-آلیل سیستئین (S-allyl cysteine; SAC) و اس-آلیل مرکاپتو سیستئین (S-allyl mercapto cysteine; SAMC) آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (Hossemi *et al.*, 2017). همچنین آلیسین به عنوان یک جزء اصلی در سیر و پیاز نقش مهمی در مهار مرگ سلولی ماکروفاژها دارد (Chang, 2006) و این خود نقش مهمی در مقابله با اثرات سوء ناشی از تکثیر مستقیم ویروس در سلول‌ها دارد. برخی ترکیبات مشتق شده از پیاز، به ویژه تیوسولفینات‌ها و سپین‌ها هم، خاصیت ضد التهابی و ضد آسم در داخل بدن دارند. به نظر می‌رسد اثرات مذکور، در مقابله با عوارض تنفسی

بهداشتی محل مطالعه و عدم ابتلای جوجه‌ها به عفونت‌های ثانویه از جمله عفونت‌های باکتریایی باشد. لذا با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر و همچنین اقتصادی بودن نسبی قیمت پیاز، به نظر می‌رسد که استفاده از پیاز قرمز به مقدار ۴ درصد جیره غذایی برای کاهش شدت بیماری آنفلوانزا در گله‌های طیور موثر و مفید باشد. برای انجام مطالعات بعدی بهتر است که تعداد جوجه‌های مورد مطالعه بیشتر در نظر گرفته شود تا علاوه بر بررسی علائم آسیب‌شناسی، امکان بررسی سایر پارامترها از جمله میزان غذای مصرفی، میزان رشد و ضریب تبدیل غذایی نیز وجود داشته باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز برای تامین اعتبار این طرح سپاسگزاریم. از دانشجوی دامپزشکی دانشگاه تبریز آقای علی شاکر نیز برای همکاری در قسمت پرورش جوجه‌ها، متشکریم. همچنین از مسئولین محترم موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال غرب کشور، بدلیل اهداء تخم مرغ‌های نطفه‌دار سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

حاضر باشد. از طرف دیگر در بررسی و مقایسه ضایعات آسیب‌شناختی در گروه‌های درمانی پیاز قرمز ۲ و ۴ درصد و همچنین گروه درمانی سیر ۴ درصد، در قلب ضایعه خاصی دیده نشد، در حالی که در گروه کنترل مثبت دژنرسانس میوسیت‌ها و حضور پراکنده‌ای از سلول‌های آماسی مشاهده گردید (شکل ۳)، البته در این خصوص هم گزارش شده که ویروس آنفلوانزا موجب نکروز میوسیت‌ها می‌شود (Pazani et al., 2008). حضور و استقرار ویروس در داخل میوسیت‌ها، به‌ویژه ویروس‌های آنفلوانزا با بیماری‌زایی بالا، موجب دژنرسانس میوسیت‌ها می‌شود (Perkins and Swayne, 2001)، لذا به نظر می‌رسد پیاز قرمز باعث داشتن خاصیت ضد ویروس آنفلوانزا با کاهش مقدار ویروس‌ها، مانع استقرار آن‌ها در داخل سلول‌های قلب شده‌است.

نتیجه نهائی این‌که به نظر می‌رسد پیاز قرمز و سیر به دلیل داشتن ترکیباتی ضدباکتریایی موجب بهبود مخاط روده در گروه‌های مسمومیت شده، همچنین با توجه به خاصیت ضدویروسی آنها احتمالاً با کاهش تعداد ویروس‌ها در روده موجب تسریع در ترمیم ضایعات بافت مخاطی ناشی از بیماری می‌شوند. در این میان اثر پیاز قرمز ۴ درصد، مشهودتر از سیر بود ولی اینکه چرا خصوصیات ضدویروسی زیاد مشهود نبود، شاید بدلیل استفاده از سیر و پیاز کامل و عدم جداسازی و استفاده از ماده مؤثره آن‌ها و همچنین به دلیل شرایط

منابع

- Aghahosseini, F.A., Barin, A., Moosakhani, F. and Ghalyanchi, L.A. (2012). Genetical Evaluation of resistance to amantadine in H9N2 Avian influenza virus in Iran between 1998 to 2009. *Veterinary Clinical Pathology*, 5(4): 1387-1395. [In Persian]
- Ahmadi, S., Rajabi, Z. and Marandi, M.V. (2018). Evaluation of the antiviral effects of aqueous extracts of red and yellow onions (*Allium cepa*) against avian influenza virus subtype H9N2. *Iranian Journal of Science and Technology*, 8(9): 23-27.
- Ahmed, I., Aslam, A., Mustafa, G., Masood, S., Ali, M.A. and Nawaz, M. (2017). Anti-avian influenza virus H9N2 activity of aqueous extracts of *Zingiber officinalis* (Ginger) and *Allium sativum* (Garlic) in chick embryos. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(4): 1341-1344.
- Alagawany, M., Elnesr, S.S., Farag, M.R., El, H.A., Mohamed, E., Khafaga, A.F., et al. (2019). Use of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) herb as a feed additive in poultry: Current knowledge and prospects. *Animals*, 9(8): 536-546.
- Al-Garib, S., Agha, A. and Al-Mesilaty, L. (2016). Low pathogenic avian influenza H9N2: world-wide distribution. *World's Poultry Science Journal*, 72(1): 125-136.
- Balzarini, J. (2006). Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Research*, 71(2-3): 237-247.
- Bayan, L., Koulivand, P.H. and Gorji, A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(1): 1-14.
- Brüll, V., Burak, C., Stoffel, W.B., Wolfram, S., Nickenig, G., Müller, C., et al. (2015). Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-) hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, 114(8): 1263-1277.
- Chung, L.Y. (2006). The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *Journal of Medicinal Food*, 9(2): 205-213.
- De, V.H., Mignon, G.S., Jeulin, C., Le, B.D.E., Leconte, M., Mallet, S., et al. (2010). Digestive tract measurements and histological adaptation in broiler lines divergently selected for digestive efficiency. *Poultry Science*, 89(9): 1955-1961.
- Hosseini, A. and Hosseinzadeh, H. (2015). A review on the effects of *Allium sativum* (Garlic) in metabolic syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, 38(11): 1147-1157.
- Faramarzi, S. and Khaki, A. (2015). Study on the effects of essential oil of *Thymus vulgaris* after administration of the LaSota vaccine on histopathological status of the trachea, humoral immune system and the performance of broilers. *Veterinary Clinical Pathology*, 9(3): 191-204. [In Persian]
- Fathihafshanjani, E. (2013). Survey of simultaneous Contamination with CIAV and infection with AI and ND in broiler chicken of Chaharmahal-va-Bakhtiari Province. *Veterinary Clinical Pathology*, 7(1): 1762-1772. [In Persian]
- Hussein, H.J., Hameed, I.H. and Hadi, M.Y. (2017). A review: Anti-microbial, anti-inflammatory effect and cardiovascular effects of garlic: *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(11): 4069-4078.
- Jaiswal, N. and Rizvi, S.I. (2014). Onion extract (*Allium cepa* L.), quercetin and catechin up-regulate paraoxonase 1 activity with concomitant protection against low-density lipoprotein oxidation in male Wistar rats subjected to oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(13): 2752-2757.
- Karimi, S., Mohammadi, A. and Dadras, H. (2014). The effect of *Echinacea purpurea* and *Sambucus-nigra* L. on H9N2 avian influenza virus in infected chicken embryo. *Veterinarski Arhiv*, 84(2): 153-165.

- Kavalcová, P., Bystrická, J., Tomáš, J., Karovičová, J. and Kuchtová, V. (2014). Evaluation and comparison of the content of total polyphenols and antioxidant activity in onion, garlic and leek. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 8(1): 272-276.
- Khan, S.U., Anderson, B.D., Heil, G.L., Liang, S. and Gray, G.C. (2015). A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of influenza A (H9N2) infection among humans. *The Journal of infectious diseases*, 212(4): 562-569.
- Khonsary, S. A. (2017). Textbook of medical physiology. *Surgical neurology international*. 13th ed., Elsevier, Hardcover. pp: 797-853.
- Killian, M.L. (2008). Hemagglutination assay for the avian influenza virus. In: *Avian influenza virus*. 1th ed. Humana Press. pp: 47-52.
- Landmann, M., Scheibner, D., Graaf, A., Gischke, M., Koethe, S., Fatola, O.I., et al. (2021). A Semiquantitative Scoring System for Histopathological and Immunohistochemical Assessment of Lesions and Tissue Tropism in Avian Influenza. *Viruses*, 13(5): 868-897.
- Mahomoodally, F., Ramcharun, S. and Zengin, G. (2018). Onion and Garlic Extracts Potentiate the Efficacy of Conventional Antibiotics against Standard and Clinical Bacterial Isolates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(9): 787-796.
- Milewski, L.M. and Khan, S.A. (2006). An overview of potentially life-threatening poisonous plants in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 16(1): 25-33.
- Mollavali, M., Bolandnazar, S.A., Schwarz, D., Rohn, S., Riehle, P. and Zaare Nahandi, F. (2016). Flavonol glucoside and antioxidant enzyme biosynthesis affected by mycorrhizal fungi in various cultivars of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(1): 71-77.
- Nili, H. and Asasi, K. (2002). Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathology*, 31(3): 247-252.
- Nili, H. and Asasi, K. (2003). Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. *Avian Diseases*, 47(s3): 828-831.
- Noda, T. and Kawaoka, Y. (2010). Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Reviews in Medical Virology*, 20(6): 380-391.
- Park, K.Y., Jeong, J.K., Lee, Y.E. and Daily, J.W. (2014). Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *Journal of Medicinal Food*, 17(1): 6-20.
- Pazani, J., Marandi, M.V., Ashrafihelan, J., Marjanmehr, S.H. and Ghods, F. (2008). Pathological studies of A/Chicken/Tehran/ZMT-173/99 (H9N2) influenza virus in commercial broiler chickens of Iran. *International Journal of Poultry Science*, 7(5): 502-510.
- Perkins, L.E.L. and Swayne, D.E. (2001). Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Veterinary Pathology*, 38(2): 149-164.
- Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14): 8997-9000.
- Ramirez, J., Guarner, F., Bustos Fernandez, L., Maruy, A., Sdepanian, V.L. and Cohen, H. (2020). Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(10): 731-740.
- Santoyo, S., Jaime, L., García-Risco, M.R., Lopez-Hazas, M. and Reglero, G. (2014). Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain antiviral agents from thyme species. *Industrial Crops and Products*, 52(1): 475-480.
- Shalini, R., Abinaya, G., Saranya, P. and Antony, U. (2017). Growth of selected probiotic bacterial strains with fructans from Nendran banana and garlic. *LWT-Food Science and Technology*, 83(9): 68-78.
- Sobenin, I.A., Andrianova, I.V., Lakunin, K.Y., Karagodin, V.P., Bobryshev, Y.V. and Orekhov, A.N. (2016). Anti-atherosclerotic effects of garlic preparation in freeze injury model of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Phytomedicine*, 23(11): 1235-1239.

- Swayne, D.E., Suarez, D.L. and Sims, D.L. (2020). Influenza. In: Disease of poultry. Swayne, D.E., Boulianne, M., Logue, C.M., McDougall, L.R., Nair, V., Suarez, D.L. editors. 14th ed., UK: London, Blackwell Sciences Ltd. pp: 210-252.
- Talat, S., Abouelmaatti, R.R., Almeer, R., Abdel, D.M.M. and Elfeil, W.K. (2020). Comparison of the effectiveness of two different vaccination regimes for avian influenza H9N2 in broiler chicken. *Animals*, 10(10): 1875.
- Tavakkoli, H., Asasi, K. and Mohammadi, A. (2011). Effectiveness of two H9N2 low pathogenic avian influenza conventional inactivated oil emulsion vaccines on H9N2 viral replication and shedding in broiler chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 12(3): 214-221.
- Vasfi, M.M. and Bozorg, M.M. (2002). Isolation of H9N2 subtype of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biomedical Journal*, 6(1): 13-7.
- Villegas, P. (2008). Titration of biological suspensions. In: Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Dufour-Za, L., Swayne, D.E., Glisson, J.R., Pearson, J.E., Reed, W.M., Jackwood, M.W. and Woolcock, P.R. editors. 5th ed., USA: American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, pp: 217-221.
- Wainright, P.O., Perdue, M.L., Brugh, M. and Beard, C.W. (1991). Amantadine resistance among hemagglutinin subtype 5 strains of avian influenza virus. *Avian Diseases*, 35(1): 31-39.
- Wang, Y., Li, C., Xiang, L., Huang, W. and He, X. (2016). Spirostanol saponins from Chinese onion (*Allium chinense*) exert pronounced anti-inflammatory and anti-proliferative activities. *Journal of Functional Foods*, 25(8): 208-219.
- Woolcock, P.R. (2008). Avian influenza virus isolation and propagation in chicken eggs. In: *Avian Influenza Virus*. 1th ed., Humana Press. pp: 35-46.