Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۳: ۳۳-۲۳

مطالعه آلودگی تجربی با باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* بر بیماری‌زایی ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H_9N_2

آیدین عزیزپور*[۱]، حسین گودرزی[۲]، عباس نوری[۲]، سعید سیفی[۳]، پیمان بیژن زاد[۴]

۱. استادیار بیماری‌های طیور، دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲. استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

۳. استادیار بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

۴ . گروه علوم درمانگاهی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۹ خرداد ۹۴ تاریخ پذیرش ۵ دی ۹۴

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عفونت ثانویه با باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال بر بیماری‌زایی ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در جوجه‌های عاری از عوامل بیماریزای خاص (SPF) بود. بدین منظور، شصت قطعه جوجه یک روزه SPF سویه لگهورن به صورت تصادفی به سه گروه بیست تایی تقسیم و به صورت جداگانه در داخل ایزولاتور فشار مثبت نگهداری شدند. در سن ۲۱ روزگی، جوجه‌های گروه اول ابتدا با 1×10^{6} EID_{50} جدایه ایرانی ویروس H9N2 آنفلوانزا به روش قطره چشمی و سه روز بعد با سویهٔ ایرانی باکتری ORT به میزان 1×10^{10} CFU به روش داخل نایی و گروه دوم صرفا با ویروس H9N2 آلوده شدند و گروه سوم بعنوان کنترل نیز با PBS تلقیح گردید. نمونه برداری از اندام‌های مختلف در طی روزهای ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶ پس از آزمایش صورت گرفت. در جوجه‌های گروه اول نشانه‌هایی نظیر کزکردگی، ژولیدگی پرها، مشکلات تنفسی، کم اشتهایی و ۱۰ درصد تلفات مشاهده گردید که اکثر مبتلایان بیشترین نشانه‌های بالینی را در روز پنجم بعد از چالش نشان دادند. در حالیکه جوجه‌های گروه دوم نشانه‌های بالینی جزئی داشتند. ویروس آنفلوانزا با افزایش عیار پادتن به استثناء بافت ریه اخذ شده از جوجه تلف شده در روز پنجم، در هیچ یک از نمونه‌های گروه اول قابل تشخیص نبود. باکتری ORT از روزهای ۸-۶ در نای و ریه‌ها و در روز ۸ پس از چالش اولیه با ویروس فقط در کبد و قلب شناسایی گردید و همچنین در جوجه های تلف شده روزهای ۵ و ۷ فقط در نای ردیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد جوجه‌های عفونی شده با ویروس آنفلوانزا در صورت ابتلا به آلودگی ثانویه با ORT باعث افزایش بیشتر حدت و جراحات ناشی از ویروس H9N2 آنفلوانزا می‌گردد.

کلمات کلیدی: *ویروس آنفلوانزا، عفونت ثانویه، باکتری ORT، بیماری‌زایی، جوجه‌های SPF*

* نویسنده مسئول: آیدین عزیزپور

آدرس: دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. تلفن: ۳۲۵۴۵۶۲۱-۰۴۵

پست الکترونیک: Aidin_azizpour@uma.ac.ir

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان عضو جنس ارتومیکسوویرس بوده و تنها تیپ نوع A آن‌ها موجب بروز بیماری در پرندگان می‌گردند (۱۸). از نظر حدت، ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به دو گروه ویروس‌های آنفلوانزای بسیار بیماری‌زا یا HPAI (Highly pathogenic avain influenza) و ویروس‌های آنفلوانزای نه چندان بیماری‌زا یا nHPAI (Non-highly pathogenic avain influenza) طبقه‌بندی می‌شوند (۱). اولین رخداد بیماری آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H_9N_2 جزء (nHPA) در ایران در خرداد ماه سال ۱۳۷۷ از یک گله تخمگذار اطراف تهران و قزوین بوده است (۲۱). سپس پژوهشگران همه‌گیری وسیع آن را در گله‌های مختلف تجاری با خسارات اقتصادی متفاوتی گزارش کردند (۱۳ و ۲۲). مطالعات تجربی در جوجه‌های SPF نشان داده است که تحت تیپ H_9N_2 ویروس آنفلوانزا دارای بیماری‌زایی پائینی می‌باشد و تلفات ناشی از آن گزارش نشده است (۵، ۹ و ۱۰). اما از دهه ۱۹۹۰ میلادی تاکنون در آسیا و کشورهای خاورمیانه تلفات بالایی در اثر ابتلا به این تحت تیپ در گله‌های تجاری گوشتی گزارش گردیده است (۷، ۱۲، ۱۳ و ۲۲). گرچه برخی تفاوت‌ها در شدت بیماری به علت اختلاف در بیماری‌زایی ویروس‌های آلوده کننده جوجه‌ها است (۱۱)، اما عوامل تغذیه‌ای و محیطی، مشکلات مدیریتی و سایر عوامل بیماری‌زا نیز نقش مهمی در عوارض حاصل از بیماری دارند (۶، ۱۱ و ۱۸). به طوری که نتایج مطالعات مختلف حاکی از بروز تلفات بالا و تشدید نشانه‌های بالینی و جراحات کالبدگشایی متعاقب عفونت‌های همزمان باکتریایی و ویروسی در پرندگان مبتلا به سویه H_9N_2 ویروس آنفلوانزا است (۳، ۴، ۹، ۱۵ و ۱۷).

با توجه به یافته‌های قبلی، ویروس آنفلوانزا و باکتری ORT هر کدام به تنهایی منجر به تلفات و بروز علایم شدید بالینی در جوجه‌های مبتلا نمی‌شوند (۲ و ۶). انجام عفونت تجربی با باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در جوجه‌های عاری از عوامل بیماریزای خاص (SPF) متعاقب تلقیح با ویروس آنفلوانزا می‌تواند در استراتژی پیشگیری از بیماریهای ترکیبی تنفسی حائز اهمیت باشد. لذا، هدف از این تحقیق بررسی اثر عفونت ثانویه با باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال بر روی بیماری‌زایی ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 در جوجه‌های SPF و مشخص کردن روند انتشار بافتی این نوع عفونت هست. نشانه‌های بالینی و کالبدگشایی و همچنین عیار پادتن بر علیه ویروس آنفلوانزا در پرندگان مبتلا نیز همزمان با شناسایی و ردیابی عوامل عفونی در بافت‌های جوجه‌های عفونی ارزیابی خواهند شد.

مواد و روش کار

نمونه‌های مورد استفاده برای آلودگی تجربی

در این مطالعه جدایه ایرانی ویروس H_9N_2 آنفلوانزا با مشخصات (A/chicken/Iran/m.1/2010) و سویه ایرانی باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* با مشخصات ORT-R87-7/1387(JF810491) از بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای پرندگان موسسه رازی انتخاب شدند (۲) که عیار ویروس به صورت ۵۰ درصد دوز عفونی کننده جنین (EID_{50}) و میزان LD_{50} باکتری به روش Reed and Muench(۱۹۳۸) محاسبه گردید (۱۶).

شرایط آزمایش

شصت قطعه جوجه SPF سویه لگهورن یک روزه به صورت تصادفی در سه گروه ۲۰ قطعه‌ای تقسیم و به صورت جداگانه در داخل ایزولاتورهای فشار مثبت در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی کرج در شرایط کنترل شده نگهداری شدند. در سن ۲۱ روزگی به تمامی پرندگان گروه اول، میزان ۰/۱ سی سی از مایع کوریوالانتوئیک عفونی حاوی EID50 ۱×۱۰^{۶} تحت‌تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا (A/chicken/Iran/m.1/2010) به روش قطره چشمی و سه روز بعد میزان ۰/۵ سی سی حاوی CFU ۱×۱۰^{۱۰} باکتری رینوتراکئال رینوتراکئال با مشخصات ORT-R87-7/1387(JF810491) به روش داخل نای تلقیح گردید و جوجه های گروه دوم فقط با ویروس H9N2 با همان ذر به روش قطره چشمی آلوده شدند (۲). گروه سوم نیز بعنوان گروه کنترل انتخاب و صرفاً PBS به روش قطره چشمی برای تلقیح استفاده شد. جوجه‌ها برای مدت ۱۶ روز به صورت روزانه به منظور بررسی نشانه‌های بالینی و مرگ و میر تحت نظر قرار گرفتند. سه پرنده از گروه‌های آزمایش و دو پرنده از گروه کنترل به صورت تصادفی در هر یک از روزهای ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ پس از چالش اولیه با ویروس انتخاب شدند و از هر پرنده به صورت جداگانه خونگیری انجام شد و سپس پرنده‌ها آسان کشی شده و از لحاظ کالبدگشایی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور جداسازی ویروس و آزمون PCR، از نای، ریه‌ها، کبد، قلب، طحال، لوزه‌های سکومی، بورس و کلواک حاوی مدفوع هر پرنده نمونه برداری انجام گرفت. به منظور کشت باکتری نیز در شرایط استریل از نای، ریه، کبد و قلب سواب تهیه گردید. به منظور بررسی عیار پادتن علیه ویروس، نمونه‌های سرمی قبل و بعد از شروع آزمایش با استفاده از تست HI مورد بررسی قرار گرفتند (۲). لازم به ذکر است که نمونه‌های اخذ شده با دستگاه هموژنیزاتور بافتی صلایه گردید و سپس با افزودن بافر نمکی فسفاته(PBS) به نسبت ۱۰ درصد به صورت سوسپانسیون هموژنیزه در آمد. جهت عاری کردن نمونه ها از آلودگی های باکتریایی احتمالی، آنتی بیوتیک هایی (۶) به محلول اضافه شدند. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ، مایع رویی حاصل شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش (ردیابی مولکولی) در فریزر ۷۰°C- نگهداری شدند (۳).

شناسایی ویروس H_9N_2

نمونه‌های صلایه و هموژنیزه شده، بعد از خارج شدن از فریزر ۷۰°C- و قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه، طبق روش استاندارد جداسازی شدند که فرآیند جداسازی و تشخیص آن به کمک تست‌های هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی آنفلوانزا بوده شده است (۲۲). برای ردیابی مولکولی ژن H9 ویروس آنفلوانزا، RNA هر یک از نمونه‌های اخذ شده بر اساس دستورالعمل کیت تجاری (Roche Applied Science, Germany) استخراج گردید و از آغازگرهای مستقیم (HU1) و معکوس (HU2) و توالی نوکلئوتیدی طبق جدول ۱ استفاده شد که جزئیات انجام واکنش RT-PCR، آماده کردن مخلوط اصلی آن و انجام واکنش رونوشت برداری معکوس و PCR توضیح داده شده است (۳).

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی و جایگاه آغازگرهای مورد استفاده در ردیابی ویروس H9N2 آنفلوانزا

الیگونوکلئوتید	ژن	توالی	اندازه قطعه تولید شده
Forward(HU1)	H9	5´-TATGGGGCATACAYCAYCC-3´	۴۸۶
Reverse(HU2c)	H9	5´- TCTATGAACCCWGCWATTGCTCC -3´	۴۸۶

ردیابی باکتری ORT

سواب‌های جمع آوری شده بر اساس روش‌های استاندارد بر روی محیط کشت آگار خوندار کشت داده شدند که شناسایی اولیه آن به کمک شکل شناسی پرگنه‌ها و داشتن بوی شبیه به اسید بوتیرک و همچنین اشکال متنوع گرم منفی به همراه دو خصوصیت بیوشیمیایی کاتالاز منفی و اکسیداز مثبت بوده است (۳). به منظور شناسایی مولکولی باکتری ORT، DNA هر یک از نمونه‌ها به روش فنل- کلروفرم استخراج شد و از آغازگرهای جلودار (OR16S-F1) و برگشتی (OR16S-R1) و توالی نوکلئوتیدی طبق جدول ۲ استفاده گردید که نحوه آماده کردن مخلوط اصلی PCRو برنامه دمایی آن بر اساس روش استاندارد (۴) بوده است (۶).

جدول ۲: ردیف‌های بازی و جایگاه 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´	۷۸۴
OR16S-R1	16S rRNA	5´- TTC GCTTGG TCT CCG AAG AT-۳´	۷۸۴

آنالیز آماری

داده‌های بدست آمده از یافته‌های سرولوژیکی با نرم افزار SPSS 13 در سطح معنی‌دار ۵ درصد آنالیز آماری شدند. جهت مقایسه داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن استفاده گردید. جهت تعیین ارتباط بین روش‌های تشخیصی از آزمون همبستگی Pearson با بسته نرم‌افزار SPSS 13 و سطح معنی‌دار ۰/۰۱ استفاده گردید.

نتایج

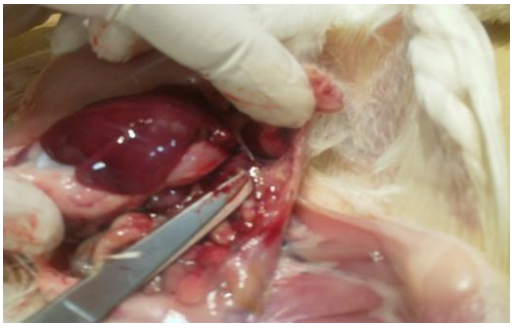
نشانه‌های بالینی و کالبدگشایی

گروه‌های عفونی

تعداد پنج قطعه (۲۵ درصد) از جوجه‌های گروه اول از روز سوم پس از چالش با ویروس، دچار کزکردگی و ژولیدگی پرها شدند که نشانه‌های خفیف تنفسی و کم اشتهایی نیز در روز چهارم ظاهر گردید. بطوریکه ۵۰ درصد پرندگان عفونی (۱۰ قطعه) بیشترین نشانه‌های بالینی را در روز پنجم نشان دادند. اما شدت نشانه‌ها از روز ششم کم و از روز نهم ناپدید شد. ۵۰ درصد مابقی پرندگان فاقد نشانه‌های بالینی بودند. در روزهای پنجم و هفتم پس از چالش اولیه با ویروس یک عدد تلفات مشاهده گردید. جوجه تلف شده روز پنجم نشانه‌هایی نظیر التهاب و پرخونی شدید نای، تورم کیسه‌های هوایی و پنومونی و جوجه تلف شده روز هفتم نیز پرخونی ملایم نای و چرکی شدن کیسه‌های هوایی داشتند. در حالی‌که فقط تعداد چهار قطعه (۲۰ درصد) از جوجه‌های گروه دوم در روزهای چهارم و پنجم پس از تلقیح، صرفا کزکردگی و ژولیدگی پرها داشتند و در کالبدگشایی نیز پنومونی در روز ششم مشاهده گردید.

گروه کنترل

در جوجه‌های گروه کنترل در طول مطالعه هیچ گونه نشانه‌های بالینی،کالبدگشایی و تلفاتی وجود نداشت.



شکل ۱- تورم و کدر شدن کیسه‌های هوایی در جوجه تلف شده روز پنجم در گروه عفونی اول

ردیابی ویروس و باکتری در اندام‌های مورد بررسی

به منظور ردیابی ویروس H9N2 و باکتری ORT در اندام‌های مختلف جوجه‌های سه گروه مورد مطالعه از روش‌های کشت، جداسازی و مولکولی استفاده گردید. به طوری‌که در اندام‌های اخذ شده از جوجه‌ها قبل از شروع آزمایش و گروه کنترل (در طول مطالعه) هیچ گونه ویروس و باکتری شناسایی نگردید. در روش‌های مولکولی، باند قطعه‌های ۴۸۶ و ۷۸۴ جفت بازی در نمونه‌های مورد آزمایش به ترتیب موید مثبت بودن از نظر ویروس H9N2 و باکتری ORT بود (۲ و ۶). با توجه به جدول ۳، ویروس آنفلوانزا به استثنای بافت ریه و کلوآک به ترتیب متعلق به جوجه تلف شده روز پنجم (گروه اول) و گروه دوم در روز ششم در هیچ کدام از نمونه‌های اخذ شده از گروه‌های آزمایش ردیابی نشد. اما باکتری ORT در چهار نمونه مورد بررسی گروه عفونی اول شناسایی گردید. به طوری‌که انتشار باکتری در اندام‌های محتلف جوجه‌های گروه اول در جدول ۴ آورده شده است. به طور خلاصه باکتری در روزهای ۶ و ۸ پس از تلقیح ویروس در نای و ریه‌ها و در روز ۸ پس از تلقیح ویروس فقط در کبد و قلب ردیابی شد و در تلفات گروه عفونی نیز باکتری فقط در نای در روزهای ۵ و ۷ پس از تلقیح شناسایی گردید. در حالی‌که در سایر نمونه‌های اخذ شده از جوجه‌های تلف شده قابل ردیابی نبود (جدول ۴).

جدول ۳: نتایج جداسازی و PCR ویروس آنفلوانزا در بافت‌های مورد بررسی طی روزهای مختلف در گروه‌های آزمایش

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

+: نمونه‌های مثبت، - نمونه‌های منفی روزهای ۵ و ۷ مربوط به جوجه‌های تلف گروه اول

جدول ۴: نتایج کشت و PCR/*اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* در گروه اول (عفونت ثانویه با ORT)

نمونه بافتی روز پس از تلقیح	۵	۶	۷	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶	روش تشخیص
نای	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	کشت/PCR
ریه	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	کشت/ PCR
کبد	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	کشت/ PCR
قلب	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	کشت/ PCR

+: نمونه‌های مثبت، - نمونه‌های منفی روزهای ۵ و ۷ مربوط به جوجه‌های تلف گروه اول

مقایسه روش‌های تشخیص ویروس

در روش جداسازی در هیچ کدام از بافتهای گروه عفونی، ویروس آنفلوانزا جداسازی نگردید. اما در روش RT-PCR ویروس فقط در ریه جوجه تلف شده در روز پنجم (گروه اول) و در کلواک گروه دوم در روز ششم ردیابی شد. سایر نتایج به دست آمده در هر دو روش جداسازی و RT-PCR کاملا مشابه بودند (جدول ۳). همبستگی بین روشهای جداسازی و RT-PCR بسیار معنی دار (P<۰/۰۱) و درصد هم خوانی دو روش تشخیصی مورد مطالعه ۹۷/۲ بود.

مقایسه روش‌های تشخیص باکتری

در کشت ۳۲ مورد نمونه‌های نای، ریه، کبد و قلب گروه عفونی و تلفات از ۶ مورد باکتری ORT جداسازی و شناسایی گردید که از نای و ریه‌ها به ترتیب ۴ و ۲ نمونه جداسازی شد. در روش PCR علاوه برآنها از نمونه‌های کبد و قلب هم باکتری ردیابی شد که در روش کشت قابل شناسایی نبود. در واقع در روش PCR نای در چهار مورد، ریه‌ها در دو مورد و کبد و قلب هرکدام در یک مورد مثبت شدند (جدول ۴). موارد منفی (۱۸ مورد گروه عفونی و ۶ مورد جوجه‌های تلف شده) نمونه‌های مورد آزمایش در نتایج کشت و PCR کاملاً همخوانی داشتند (جدول ۴). لازم بذکر است که تمامی نمونه‌های مثبت روش کشت از طریق PCR نیز مورد تأیید قرار گرفتند. همبستگی بین روش‌های کشت و PCR بسیار معنی دار (P<۰/۰۱) و درصد همخوانی دو روش تشخیصی مورد مطالعه ۹۲/۴ بود.

بررسی پادتن بر علیه ویروس در گروه‌ها

نتایج عیار پادتن HI علیه ویروس H9N2 آنفلوانزا در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۵ نشان داده شده است. لازم به ذکر است در روزهای صفر و دوم پس از چالش اولیه با ویروس هیچ‌کدام از گروه‌های عفونی و کنترل بر علیه آنفلوانزا پادتنی نشان ندادند. همچنین گروه کنترل در طی دوره مطالعه پادتنی بر علیه ویروس آنفلوانزا نداشت. در گروه‌های آزمایش میانگین عیار HI از روز چهارم به بعد در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی دار بیشتر بود (P<۰/۰۵). بیشترین میزان پادتن در گروه عفونت ثانویه با ORT نسبت به آنفلوانزای انفرادی مشاهده گردید که این تفاوت در روزهای ۴ و ۱۶ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

جدول ۵: نتایج میانگین عیار پادتن HI علیه آنفلوانزا در روزهای مختلف پس از تلقیح در گروه‌های مورد مطالعه

روز پس از تلقیح	۰	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶
گروه ها									
آزمایش اول	۰ a	۰ a	۱/۶±۰/۳۳ b	۵/۳±۰/۳۳ b	۶/۳±۰/۸۸ b	۷/۰±۰/۵۷ b	۷/۲±۰/۰۰ b	۷/۶±۰/۳۳ b	۸/۳±۰/۳۳ c
آزمایش دوم	۰ a	۰ a	۰±۰/۰۰ a	۵/۲±۰/۴۶ b	۶/۱±۰/۵۳ b	۶/۶±۰/۱۸ b	۶/۸±۰/۳۳ b	۶/۴±۰/۲۹ b	۶/۲±۰/۵۱ b
کنترل	۰ a	۰ a	۰±۰/۰۰ a	۰±۰/۰۰ a	۰±۰/۰۰ a	۰±۰/۰۰ a	۰±۰/۰۰ a	۰±۰/۰۰ a	۰±۰/۰۰ a

A و B: نشانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

آزمایش اول: عفونت ثانویه با ORT

آزمایش دوم: آنفلوانزای انفرادی

بحث

در طی سال‌های اخیر بیماری‌های ترکیبی تنفسی در مزارع پرندگان شیوع پیدا کرده است و عوامل مختلف بیماری‌زا در ایجاد بیماری‌های ترکیبی نقش دارند که هر یک از آن‌ها به طور اولیه و ثانویه می‌توانند خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت مرغداری وارد نمایند. از عوامل عفونی اولیه دخیل در بیماری‌های تنفسی پرندگان، ویروس آنفلوانزای پرندگان است. علی‌رغم اینکه ویروس H_9N_2 جزء دسته ویروس‌های آنفلوانزا با بیماری‌زایی پایین طبقه بندی می‌شود (۳، ۶، ۱۰، ۱۱ و ۱۸). اما تلفات بین ۲۰ تا ۶۰ درصد همراه با نشانه‌های بالینی شدید از قبیل تورم بافت‌های اطراف چشم و سینوس‌ها، ترشحات دستگاه تنفس و مشکلات تنفسی در مزارع درگیر کشور گزارش شده است (۱۳). به نظر می‌رسد عفونت‌های باکتریایی و ویروسی به صورت همزمان یا ثانویه در تشدید عوارض و تلفات ویروس H_9N_2 آنفلوانزا دخیل هستند. یکی از این عوامل ثانویه مهم باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* است که در بیماری‌های ترکیبی تنفسی پرندگان گزارش شده است (۳). با این حال مطالعات کاملی روی عفونت ثانویه با

باکتری ORT در جوجه‌های مبتلا به ویروس آنفلوانزا تا به حال صورت نگرفته است تا نقش باکتری در تشدید حدت و جراحات ناشی از ویروس H_9N_2 دقیقاً مشخص شود. لذا در مطالعه حاضر اثر ORT بر بیماری‌زایی ویروس H_9N_2 آنفلوانزا در جوجه‌های SPF مورد بررسی قرار گرفت و به منظور ردیابی و شناسایی دقیق عوامل عفونی در اندام‌های مورد بررسی از روش‌های کشت و جداسازی توام با روش مولکولی استفاده گردید (۲، ۳، ۵، ۱۴ و ۲۲).

Pan و همکاران (۲۰۱۲) در عفونت تجربی با باکتری ORT متعاقب تلقیح با ویروس H9N2 آنفلوانزا در جوجه‌های گوشتی ۳ هفته گزارش کردند نشانه‌های بالینی و جراحات کالبدگشایی به مراتب کمتر از گروه همزمان (ویروس آنفلوانزا و باکتری ORT) بود. به‌طوری‌که تعدادی از جوجه‌های مبتلا به مدت ۴ روز پنومونی داشتند. همچنین در این تحقیق بیان نمودند میزان تلفات ناشی از آلودگی اولیه با آنفلوانزا و آلودگی ثانویه با ORT در مقایسه با گروه آنفلوانزا به تنهایی (۱۰ درصد) به طور معنی دار افزایش و به میزان ۳۰ درصد رسید (۱۵). نتایج فوق با مطالعه حاضر در گروه‌های عفونی از نظر میزان تلفات تفاوت دارد که این اختلاف مربوط به حدت غیر معمول باکتری ORT و نوع بیماریزایی جدایه‌های ویروس H9N2 و همچنین روش تلقیح آن‌ها، نوع نژاد، سویه و سن پرنده می‌باشد. Azizpour و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که عفونت همزمان ویروس H9N2 آنفلوانزا با باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در جوجه‌های SPF نژاد لگهورن ۳ هفته نه تنها موجب تشدید نشانه‌های بالینی و جراحات کالبدگشایی ناشی از ویروس آنفلوانزا می‌شود، بلکه موجب افزایش میزان تلفات تا ۱۵ درصد و طولانی شدن دوره دفع ویروس آنفلوانزا نیز می‌گردد. آنها همچنین گزارش کردند ۵۰ درصد از پرندگان تلقیح شده با این دو عامل بیماری‌زا بین روزهای ۲ تا ۹ پس از تلقیح نشانه‌های بالینی و کالبدگشایی نسبتا شدیدی داشتند که بیشترین نشانه‌های بالینی در روز سوم پس از تلقیح بود (۲).

مطالعه تجربی انجام شده توسط Seifi و همکاران (۲۰۱۲) بر عفونت همزمان ویروس H9N2 آنفلوانزا و سروتیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی در جوجه‌های گوشتی نشان داد که اکثر جوجه‌های عفونی شده با این دو ویروس بین روزهای ۲ تا ۸ پس از چالش نشانه‌های بالینی و جراحات کالبدگشایی شدیدی داشتند. در حالی‌که در گروه‌های آنفلوانزا و برونشیت به‌تنهایی نشانه‌های بالینی ملایم بود و میزان تلفات در گروه‌های آنفلوانزا و برونشیت به تنهایی ۵ درصد و در گروه همزمان ویروس‌های آنفلوانزا و برونشیت عفونی به ۲۰ درصد رسید (۱۷). Thachil و همکاران (۲۰۰۹) در مرغان تخم گذار SPF سویه لگهورن ۸ هفته نشان دادند که در جوجه‌های آلوده شده به طور همزمان با ویروس برونشیت عفونی و باکتری E.coli نشانه‌های بالینی و تلفات به مراتب بیشتر از گروه‌های IVB و E.coli به - تنهایی بود و همچنین این پژوهشگران گزارش کردند وقتی گروه همزمان برونشیت عفونی و اشریشیاکلی در معرض آلودگی ثانویه با باکتری ORT قرار گرفتند نشانه‌های بالینی و جراحات کالبدگشایی و همچنین تلفات شدیدتری نسبت به گروه همزمان ویروس برونشیت عفونی و باکتری E.coli ایجاد گردید (۱۹).

Haghighat-Jahromiو همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند عفونت همزمان ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2با واکسن زنده ویروس برونشیت عفونی (سویه H120) سبب تشدید نشانه‌های بالینی و کالبدگشایی ناشی از ویروس آنفلوانزا می‌شود. در حالی‌که ویروس

H9N2 به تنهایی تلفات و نشانی آن چنانی نداشت (۹). در مطالعه حاضر علایمی نظیر کزکردگی، ژولیدگی پرها، درگیری خفیف تنفسی، کاهش وزن‌گیری، ۱۰ درصد تلفات، التهاب و پرخونی نای، تورم و چرکی شدن کیسه‌های هوایی و پنومونی در گروه عفونت ثانویه با ORT متعاقب تلقیح ویروس آنفلوانزا در مقایسه با گروه آنفلوانزا به تنهایی مشاهده گردید که با گزارش‌های مطالعات پیشین همسو می‌باشد (۲ و ۱۵) و نشان دهنده‌ی تشدید شدن علایم بالینی و کالبدگشایی در اثر عفونت با ORT هست.

Azizpour و همکاران (۲۰۱۴) در عفونت تجربی همزمان ویروس H9N2 آنفلوانزا با باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در جوجه‌های SPF گزارش کردند که ویروس از نای و ریه‌ها در روزهای ۲ و ۴ پس از چالش، بورس فابریسیوس در روزهای ۲ و ۶ پس از تلقیح، کبد و تیموس در روز ۲ پس از چالش و کلیه‌ها در روز ۸ پس از تلقیح قابل جداسازی هست. ولی این پژوهشگران نتوانستند ویروس را در لوزه‌های سکومی، طحال و کلوآک ردیابی کنند (۲۲). Kwon و همکاران (۲۰۰۸)، با تلقیح تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا در جوجه‌های SPF، دچار تضعیف سیستم ایمنی با سن سه هفته نشان دادند که آنتی‌ژن‌های ویروسی در کلیه‌ها، طحال، نای، ریه‌ها، تیموس، بورس فابریسیوس و لوزه‌های سکومی در ۵ روز پس از تلقیح قابل جداسازی است (۱۰). در تحقیق Noroozian و همکاران (۲۰۰۷)، ردیابی ویروس H9N2 توسط سواب کلواکی اخذ شده در جوجه‌های عفونی از راه چشمی –بینی صورت گرفت که بیشترین میزان مربوط به روز ۵ پس از تلقیح بود که تمام سواب ها مثبت بودند (۱۴). Bano و همکاران (۲۰۰۳)، با تلقیح جدایه A/chicken/Pakistan/31/01(H9N2) ویروس آنفلوانزا با روش‌های مختلف به ماکیان و سپس مواجه کردن آن‌ها با سایر عوامل عفونی (شامل؛ ویروس برونشیت عفونی، اورنیتوباکتریم راینوتراکئال و اشریشیاکلی)، آنتی‌ژن ویروس را در بافت‌های نای، ریه‌ها، کلیه و بورس فابریسیوس ردیابی کردند (۵). در مطالعه حاضر ویروس آنفلوانزا با افزایش پادتن در هیچ‌کدام از نمونه‌های مورد بررسی به استثناء ریه و کلوآک گروه‌های عفونی شناسایی نشد. Van Beek و همکاران (۱۹۹۴) در مطالعه تجربی نشان دادند که باکتری علاوه بر اندام‌های تنفسی از خون قلب، کبد، مفاصل، مغز، تخمدان ها و مجرای تخم بر نیز قابل جداسازی و شناسایی است (۲۰۲۰). Thachil و همکاران (۲۰۰۹) در مرغان تخم‌گذار SPF سویه لگهورن نشان دادند در جوجه‌های آلوده شده به طور همزمان با اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، برونشیت عفونی و اشریشیاکلی، باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در ریه‌ها، سینوس‌های تحت حدقه‌ای، نای، کبد، کیسه‌های هوایی، مجرای تخم بر و کلیه ها قابل شناسایی است و همچنین آن‌ها گزارش کردند باکتری از کیسه‌های هوایی و نای تا دو هفته و سینوس‌های تحت حدقه‌ای تا ۴ هفته پس از آلودگی ثانویه با ORT قابل ردیابی است (۱۹). Azizpour و همکاران (۲۰۱۴) توانستند در جوجه های SPF آلوده شده بطور همزمان با ویروس H9N2 آنفلوانزا و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، باکتری ORT را در ریه‌ها، نای، کبد و قلب ردیابی کنند (۲). در مطالعه حاضر حضور باکتری باکتری در نای و ریه‌ها در روزهای ۶ و ۸ پس از تلقیح و در کبد و قلب در روز ۸ پس از تلقیح اولیه با ویروس و در جوجه‌های تلف شده فقط در نای ردیابی شد که یافته-های به دست آمده با نتایج مطالعات پیشین در مورد تکثیر باکتری در اندام های داخلی اندام‌های داخلی هم

خوانی دارد (۲،۱۷ و ۲۰) و نشان دهنده‌ی سیستمیک بودن عفونت است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مطابق گزارش‌های پیشین، ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 به تنهایی به عنوان عامل اولیه در جوجه های SPF عوارض مهمی ایجاد نمی‌کند (۲ و ۹). اما در صورت ابتلا به عفونت ثانویه با باکتری ORT باعث افزایش تلفات تا میزان ۱۰ درصد و تشدید نشانه‌های بالینی و جراحات کالبدگشایی ناشی از ویروس H9N2 می‌گردد. به دلیل اهمیت عفونت‌های ثانویه پیشنهاد می‌شود نقش سایر عوامل بیماری‌زا نظیر نیوکاسل، برونشیت عفونی، گامبورو، اشریشیاکولی، هموفیلوس پاراگالیناروم و مایکوپلاسما در عوارض حاصل از بیماری آنفلوانزا در نژادها و سویه‌های مختلف پرندگان تجاری مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1.Alexander, D. J. (2007). Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. *Avian Diseases* **51:** 161-166.

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

3.Banani, M., Momayez, R., Pourbakhsh, S. A., Goodarzi, H., Bahmani Nejad, M. A. (2002). Simulataneous Isolation of *Ornithobacterium Rhinotracheale* and Avian Influenza Virus Subtype H_9N_2 from Commercial Poultry. *Iranian Journal of Veterinary Reasearch* **3**:100-115.

4.Banani, M., Pourbakhsh, S. A., Erami, M., Gholamin,F., Fatehmanesh, M. (2008). Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* using polymerase chain reaction (PCR). *Iranian Journal of Veterinary Research* **6**: 41-45.

5.Bano, S., Naeem, K., Malik, S. A. (2003). Evaluation of Pathogenic Potential of Avian Influenza Virus Serotype H_9N_2 in Chickens. *Avian Diseases*. **47**: 817-822.

6.Goudarzi, H., Azizpour, A., Banani, M., Nouri, A., Seifi, S. (2015). Survey of tissue tropism and dissemination of ORT-R87-7/1387 strain of *Ornithobacterium rhinotracheale* in SPF chickens**.** *Pajouhesh* Va *Sazandgi* **27:** 2-8.

7.Guo, Y.J., Krauss, S., Senne, D.A., Mo, I.P., Lo, K.S., Xiong, X.P.(2000). Characterization of the Pathogenicity of Members of the Newly Established H_9N_2 Influenza Virus Lineages in Asia. *Virology* **267**: 279-288.

8.Hadipour, M.M., Farjadian, S.H., Azad, F., Kamravan, M., Dehghan, A. (2011). Nephropathogenicity of H_9N_2 Avian Influenza Virus in Commercial Broiler Chickens Following Intratracheal Inoculation. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **10**:1706-1710

9.Haghighat-Jahromi, M., Asasi, K., Nili, H., Dadras, H.,Shooshtari, A. H. (2008). Coinfection of Avian Influenza Virus (H_9N_2 Subtype) with Infectious Bronchitis Live Vaccine. *Archives of Virology* **53**: 651-655.

10.Kwon, J.S., Lee, H.J., Lee, D.H., Lee, Y.J., Mo, I.P., Nahm S.S. (2008). Immune Responses and Pathogenesis in Immunocompromised Chickens in Response to Infection with the H_9N_2 Low Pathogenic Avian Influenza Virus. *Virus Research* **133**:187-194.

11.Mosleh, N., Dadras, H., Mohammadi, A. (2009). Evaluation of H_9N_2 Avian Influenza Virus Dissemination in Various Organs of Experimentally Infected Broiler Chickens Using Rt-Pcr. *Iranian Journal of Veterinary Research* **10**:12-20.

12.Naeem, K., Ullah, A., Manvell, R.J., Alexander, D.J. (1999). Avian Influenza a Subtype H_9N_2 in Poultry in Pakistan. *Veterinary Research* **145**: 560-565.

13.Nili, H., Asasi, K. (2003). Avian Influenza (H_9N_2) Outbreak in Iran. *Avian Diseases* **47**: 828-831.

14.Noroozian, H., Vasfi Marandi, M., Razazian, M. (2007). Detection of avian influenza virus of H_9 subtype in the faeces of experimentally and naturally infected chickens by reverse transcription –

Polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria Brno* **76**: 405-413.

15. Pan, Q., Liu, A., Zhang, F., Ling, Y., Ou, C., Hou, N., He, C. (2012). Co-infection of broilers with *Ornithobacterium rhinotracheale* and H_9N_2 avian influenza virus. *BMC Veterinary Reasearch* **8**:104. doi:10.1186/1746-6148-8-104.
16. Reed, L. J. and Muench, H.(1938) A simple method of estimation of 50% end points. *American. J. Hyg*. 27: 493–497.
17. Seifi, S., Asasi, K., Mohammadi, A. (2012). An experimental study on broiler chicken co-infected with the specimens containing avian influenza (H_9 subtype) and infectious bronchitis (4/91 strain) viruses. *Iranian Journal of Veterinary Research* **13**:138 - 142.
18. 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.
19. 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. *Journal of Applied Poultry Reaserch* **18**:780–788.
20. Van Beek, P.N.G.M., Van Empel, P.C., Van den Bosch, G., Stonn, P.K., Bongers, J.H., Du Preez, J.H. (1994). Respiratory problems, growth retardation and arthritis in turkeys and broilers caused by a Pasteurella-lik organism: Ornithobacterium rhinotracheale or ‘Taxon 28 . *Tijdschr Diergeneeskd* **119**: 99–101.
21. 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.
22. Vasfi Marandi, M.,Bozorgmehri Fard, M. H. (2002). Isolation of H_9N_2 subtybe of avian influenza viruses during outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biomedical Journal* **6**:13-17.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 2, 2016

A study of Experimental Infection with *Ornithobacterium Rhinotracheale* on Pathogenesis of Avian Influenza Virus H_9N_2 Subtype

Azizpour, A.[1*], Goudarzi, H.[2], Nouri, A.[2], Seifi, S.[3], Bijanzad, P.[4]

1. Assistant Professor of Poultry Diseases, Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Department of Avian Diseases Research and Diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
3. Assistant Professor of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
4. Department of Clinical Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Received Date: 9 June 2015 *Accepted Date: 26 December 2015*

Abstract
The purpose of this study was to investigate effect of secondary infection with Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) on pathogenesis of avain influenza virus subtype H9N2 in specific pathogen-free (SPF) chickens. Sixty, one-day-old SPF chicks were randomly divided into three groups. They were kept in separate positive pressure isolators. On 21st day of study, the chicks in group 1 was infected intraocularly with 1×10^6 EID_{50} of H9N2 and three days later intratracheally with 1×10^{10} CFU of ORT, group 2 only inoculated with H9N2 AI virus, intraocularly. Control group was inoculated with PBS, intraocularly. The samples from various tissues were collected at 6, 8, 10, 12, 14 and 16 days post-inoculation (DPI). In first group chickens exhibited ruffled feathers, depression, respiratory signs, reduced appetite and 10% mortality. The most remarkable clinical signs appeared on day 5 PI. While in second group had minor clinical signs. The H9N2 virus was not detected from organs of group 1 with increasing antibody except lungs of died bird on days 5 PI. The ORT was detected in the trachea and lungs on days 6 and 8 PI. The bacteria was also found in the heart and liver on day 8 PI and in trachea of died birds on days 5 and 7 PI. The results showed that infected chickens with the H9N2 AI virus under secondary infection by ORT cause exacerbate virulence and lesions of H9N2.

Key words: *Avain influenza virus; Secondary infection, ORT, Pathogenesis, SPF chickens*

**Corresponding author: Azizpour, A.*
Address: Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Tel: 32545621-045
Email: Aidin_azizpour@uma.ac.ir