

بررسی جراحات هیستوپاتولوژیک ناشی از آلودگی تجربی همزمان ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال

آیدین عزیزپور^{۱*} حسین گودرزی^۲ سعید چرخکار^۳ رضا ممیز^۲ محمد حسن حبل الوریذ^۴ پیمان بیژن زاده^۵

(۱) دانشکده کشاورزی مشهدین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

(۲) بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، کرج، ایران

(۳) گروه بیماریهای طیور، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران

(۴) بخش پاتولوژی، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، کرج، ایران

(۵) گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

(دریافت مقاله: ۱۵ بهمن ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۲ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: علی‌رغم اینکه ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) به تنهایی قادر به ایجاد جراحات هیستوپاتولوژیک در پرندگان عفونی هستند. اما تا به حال، مطالعه‌ای در خصوص جراحات بافتی ناشی از این عوامل بیماری‌زا به صورت همزمان در جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زای خاص (SPF) انجام نشده است. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی نوع، شدت و میزان جراحات بافتی عفونت همزمان ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال در جوجه‌های SPF می‌باشد. **روش کار:** تعداد ۶۰ قطعه جوجه SPF نژاد لگهورن یک روزه به صورت تصادفی در سه گروه بیست تایی تقسیم شدند. سپس در سن ۲۱ روزگی، جوجه‌های گروه اول فقط با ویروس آنفلوآنزا و جوجه‌های گروه دوم با ویروس آنفلوآنزا و باکتری ORT به طور همزمان تلقیح شدند و گروه سوم بعنوان کنترل PBS دریافت کردند. در روزهای ۲ تا ۱۶ پس از تلقیح، سه پرندۀ از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. نمونه‌های بافتی از نای، ریه، کبد، کلیه، بورس فابریسیوس، تیموس، طحال و لوزه‌های سکومی جهت مطالعه هیستوپاتولوژی اخذ گردید و پس از آماده سازی و تهیه مقاطع بافتی به ضخامت‌های ۶-۵ میکرونی با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. **نتایج:** شدت جراحات هیستوپاتولوژی در جوجه‌های گروه دوم نسبت به گروه اول بیشتر بود. هیچ گونه تغییرات بافتی در گروه کنترل مشاهده نشد. نتیجه‌گیری نهایی: نتایج این مطالعه نشان داد در جوجه‌های عفونی شده به طور همزمان با تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوآنزا و باکتری ORT، جراحات هیستوپاتولوژی ناشی از ویروس آنفلوآنزا تشدید می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: ویروس آنفلوآنزای پرندگان، ORT، جراحات هیستوپاتولوژی، جوجه‌های SPF

مقدمه

تیپ H9N2 ویروس آنفلوآنزا و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) در کشور تأیید شده است (۴). علی‌رغم اینکه ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 و باکتری ORT به تنهایی قادر به ایجاد جراحات هیستوپاتولوژیک مشخص در پرندگان عفونی هستند و در مورد جراحات پاتولوژی هر کدام از این عوامل بیماری‌زا مطالعات زیادی انجام شده است (۲۵، ۲۴، ۱۴، ۱۱، ۱۰، ۹، ۳). اما تا به حال مطالعه‌ای بر روی ضایعات هیستوپاتولوژیکی ناشی از عفونت همزمان ویروس H9N2 آنفلوآنزا و باکتری ORT در جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زای خاص (SPF) صورت نگرفته است تا جراحات بافتی مرتبط با این عفونت دقیقاً مشخص گردد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی نوع جراحات بافتی عفونت همزمان تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوآنزا و باکتری ORT در جوجه‌های SPF و مشخص نمودن میزان و شدت این جراحات می‌باشد.

مواد و روش کار

در این بررسی جدایه ایرانی ویروس آنفلوآنزای طیور تحت تیپ

آنفلوآنزای پرندگان یک بیماری ویروسی نسبتاً حاد دستگاه تنفسی و شدیداً مسری با انتشار جهانی می‌باشد (۲۱). ویروس‌های آنفلوآنزا متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده می‌باشند که تنها تیپ A آن‌ها در پرندگان باعث بیماری می‌شوند (۲۱، ۱). پس از اپیدمی آنفلوآنزای پرندگان در ایران، ویروس جدا شده تحت تیپ H9N2 تشخیص و نامگذاری گردید که از نظر حدت شدیداً بیماری‌زا نمی‌باشد (۲۶). اما در طی دهه‌های اخیر، گزارش‌های زیادی مبنی بر درگیری گله‌های صنعتی کشورهای خاورمیانه به ویژه ایران با ویروس آنفلوآنزای A تحت تیپ H9N2 وجود دارد که این ویروس بطور مداوم مشکلات جدی و خسارات نسبتاً سنگینی به پیکر صنعت طیور وارد کرده است (۲۳، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۲، ۱). در حالیکه این ویروس به تنهایی فقط قادر به ایجاد بیماری خفیف می‌باشد (۲۶، ۱۳، ۶).

بر اساس گزارش‌های علمی، در صورت ظهور شرایط مستعد کننده نظیر ابتلا به عفونت‌های همزمان ویروسی و باکتریایی، بیماری‌زایی ویروس H9N2 آنفلوآنزا تشدید می‌یابد (۱۹، ۱۸، ۱۳، ۸، ۴، ۲). به طوری که در طی سال ۱۳۷۹ در کمپلکس‌های تنفسی با تلفات زیاد، عفونت همزمان تحت



جدول ۱. مقایسه جراحات هیستوپاتولوژی بافت‌های نای، ریه، کلیه و کبد در سه گروه مورد مطالعه. گروه اول: آنفلوآنزا؛ گروه دوم: همزمان آنفلوآنزا و ORT؛ گروه سوم: کنترل. a, b, c: نشانگر اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها می‌باشد ($p < 0.05$).

اندام	گروه	روزهای پس از تلقیح							
		۱۶	۱۴	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲
نای	اول	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰ ^a	۷۲۰±/۲۲ ^a	۷۴۰±/۳۶ ^a	۲/۰۰±/۴۸ ^b	۲/۸۰±/۳۱ ^b	۳/۰۰±/۲۴ ^b	۲/۲۰±/۲۵ ^b
	دوم	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۲۰±/۳۲ ^a	۷۴۰±/۲۵ ^a	۲/۰۰±/۳۱ ^b	۲/۶۰±/۲۴ ^c	۳/۶۰±/۴۶ ^c	۳/۲۰±/۲۰ ^c	۲/۶۰±/۲۵ ^b
	سوم	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a
ریه	اول	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۲۰±/۲۴ ^a	۷۴۰±/۲۵ ^a	۲/۸۰±/۲۰ ^b	۳/۰۰±/۳۱ ^b	۲/۶۰±/۵۶ ^b	۷/۶۰±/۲۵ ^a
	دوم	۷۸۰±/۳۷ ^a	۲/۶۰±/۴۰ ^b	۳/۶۰±/۲۸ ^b	۳/۸۰±/۲۰ ^b	۳/۶۰±/۱۲ ^c	۳/۴۰±/۴۲ ^c	۳/۰۰±/۶۸ ^c	۲/۰۰±/۱۴ ^b
	سوم	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a
کلیه	اول	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۲۰±/۲۴ ^a	۷/۶۰±/۱۸ ^a	۲/۲۰±/۲۰ ^b	۲/۸۰±/۳۸ ^b	۳/۴۰±/۵۴ ^b	۳/۴۰±/۲۴ ^b	۲/۴۰±/۲۵ ^b
	دوم	۷/۶۰±/۲۰ ^a	۲/۲۰±/۵۲ ^b	۳/۰۰±/۲۴ ^b	۳/۴۰±/۴۷ ^c	۳/۸۰±/۵۴ ^c	۳/۴۰±/۶۲ ^c	۲/۸۰±/۴۴ ^b	۲/۲۰±/۲۴ ^b
	سوم	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a
کبد	اول	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷/۲۰±/۲۰ ^a	۷/۶۰±/۳۷ ^b	۲/۲۰±/۳۷ ^b	۷/۶۰±/۳۷ ^b	۷/۴۰±/۵۴ ^b	۷۰۰±/۰۰ ^a
	دوم	۷/۲۰±/۱۰ ^a	۷/۴۰±/۳۸ ^a	۷/۶۰±/۱۳ ^a	۲/۲۰±/۴۹ ^b	۲/۶۰±/۳۷ ^c	۲/۸۰±/۲۴ ^c	۷/۸۰±/۶۵ ^b	۷/۶۰±/۳۱ ^b
	سوم	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a	۷۰۰±/۰۰ ^a

شدند. مقاطع پس از پارافین‌زدایی و رنگ‌آمیزی با روش هماتوکیسین و اتوزین در بخش پاتولوژی موسسه سرم‌سازی رازی کرج مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱، ۱۰). پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی از گروه‌های آزمایش و کنترل، این مقاطع از لحاظ آسیب‌های پاتولوژیک بررسی شدند. به این منظور، انواع ضایعات مشاهده شده بر اساس شدت جراحات از ۱ تا ۴+ (۱+) بافت طبیعی، ۲+ آسیب جزئی، ۳+ آسیب متوسط، ۴+ آسیب شدید) طبق روش Bijanzad و همکاران در سال ۲۰۱۳ درجه‌بندی گردید (۷) و نهایتاً از جراحات بافت‌های مورد مطالعه عکس برداری صورت گرفت.

آنالیز آماری: داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ver. ۱۸. مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای مقایسه جراحات بافتی گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آماری غیر پارامتری کروسکال والیس (Kruskal Wallis) استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

علائم بالینی و کالبدگشایی گروه‌های مورد مطالعه: تعداد اندکی از جوجه‌های گروه اول (۲۰٪) صرفاً کز کردگی و ژولیدگی پرها داشتند و در کالبدگشایی نیز فقط پنومونی در ریه مشاهده گردید. در حالیکه تعداد ۶ قطعه (۳۰٪) از جوجه‌های گروه دوم از روز دوم دچار کز کردگی، ژولیدگی پرها، کم‌اشتهایی و مشکل تنفسی شدند. بطوریکه اکثر جوجه‌ها بیشترین علائم بالینی را در روز سوم نشان دادند که در طول آزمایش ۳ عدد تلفات مشاهده گردید و در کالبدگشایی پرخونی نای، تورم کیسه‌های هوایی (تصویر ۱)، پنومونی، تورم کلیه‌ها و کبد وجود داشت. اما جوجه‌های گروه کنترل در طول مطالعه هیچ‌گونه علائم بالینی و کالبدگشایی و تلفاتی نداشتند. یافته‌های هیستوپاتولوژی: جراحات بافتی اندام‌های مورد مطالعه در

(H9N2) A/chicken/Iran/m/1.2010 (JF810491) جدا شده از گله‌های طیور تجاری کشور که بیماری‌زایی آن با استفاده از روش‌های مولکولی تأیید شده بود (۵)، از بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج به جوجه‌های SPF نژاد لگهورن گروه آزمایش تلقیح گردیدند. ابتدا شصت قطعه جوجه از شرکت ونکی کشور هند (Venkey's, India) تهیه و در سن یک روزگی به صورت تصادفی به سه گروه ۲۰ تایی تقسیم و به صورت جداگانه در داخل ایزولاتورهای فشار مثبت (ساخت کشور اسکاتلند Bell Isolation System) در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه سرم‌سازی رازی کرج در شرایط کنترل شده نگهداری شدند. سپس در سن ۲۱ روزگی، تمامی جوجه‌های گروه اول فقط با ویروس H9N2 با دز 1×10^6 EID₅₀ به روش قطره چشمی تلقیح شدند و پرندگان گروه دوم بطور همزمان با ویروس H9N2 و باکتری ORT به ترتیب با دزهای 1×10^6 EID₅₀ و 1×10^{10} CFU به روش‌های قطره چشمی و داخل نایی آلوده شدند. گروه سوم بعنوان کنترل صرفاً PBS به روش قطره چشمی دریافت کردند. پس از تلقیح عوامل بیماری‌زا تمامی جوجه‌ها از نظر علائم بالینی و تلفات به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و علائم کالبدگشایی نیز ثبت گردید. در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ پس از تلقیح، تعداد سه جوجه از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و به روش انسانی کشته و کالبدگشایی شدند (۲). سپس از بافت‌هایی نظیر نای، ریه، کبد، کلیه، بورس فابریسیوس، تیموس، طحال و لوزه‌های سکومی نمونه‌برداری به عمل آمد.

جهت مطالعات هیستوپاتولوژی، نمونه‌های اخذ شده به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول فرمالین بافر ۱۰٪ فیکس گردیدند و پس از طی مراحل پاساژ بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی با ضخامت‌های ۵-۶ μm برش داده



جدول ۲. مقایسه جراحات هیستوپاتولوژی بافت‌های بورس، طحال، تیموس و لوزه سکومی در سه گروه مورد مطالعه. گروه اول: آنفلوانزا؛ گروه دوم: همزمان آنفلوانزا و ORT؛ گروه سوم: کنترل. b, c, a, نشانگر اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها می‌باشد ($p < 0.05$).

اندام	گروه	روزهای پس از تلقیح							
		۱۶	۱۴	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲
بورس فابریسیوس	اول	۷/۲۰±/۳۰ ^a	۷/۸۰±/۲۸ ^a	۲/۴±/۴۲ ^b	۲/۸۰±/۳۶ ^b	۲/۶±/۴۸ ^b	۲/۲±/۴۰ ^b	۲/۰±/۳۰ ^b	۷/۴±/۲۵ ^a
	دوم	۷/۸۰±/۱۲ ^b	۲/۶±/۲۰ ^b	۳/۸۰±/۲۰ ^c	۳/۶±/۳۱ ^c	۳/۲±/۶۵ ^c	۳/۰±/۲۰ ^c	۲/۸±/۲۴ ^{bc}	۲/۰±/۳۰ ^b
	سوم	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a
طحال	اول	۷/۰±/۰ ^a	۷/۲±/۰ ^a	۷/۴±/۳۲ ^a	۷/۸±/۱۲ ^b	۷/۸±/۳۰ ^b	۷/۴±/۲۶ ^a	۷/۲±/۴۲ ^a	۷/۰±/۰ ^a
	دوم	۷/۸±/۲۰ ^b	۲/۸±/۱۲ ^b	۳/۸±/۸۴ ^b	۳/۴±/۴۲ ^c	۳/۰±/۵۶ ^c	۲/۸±/۱۴ ^b	۲/۲±/۳۸ ^b	۷/۶±/۲۴ ^a
	سوم	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a
تیموس	اول	۷/۰±/۰ ^a	۷/۲±/۲۴ ^a	۷/۶±/۱۸ ^a	۷/۸±/۲۰ ^b	۲/۲±/۳۸ ^b	۷/۶±/۴۰ ^b	۷/۴±/۲۴ ^a	۷/۰±/۰ ^a
	دوم	۷/۶±/۱۲ ^b	۲/۴±/۲۰ ^b	۳/۰±/۴۰ ^b	۳/۴±/۳۷ ^c	۳/۰±/۴۰ ^c	۲/۸±/۲۴ ^c	۲/۴±/۴۷ ^b	۷/۶±/۳۲ ^a
	سوم	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a
لوزه‌های سکومی	اول	۷/۰±/۰ ^a	۷/۴±/۱۰ ^a	۷/۶±/۲۰ ^a	۲/۰±/۳۷ ^b	۲/۲±/۵۲ ^b	۷/۶±/۱۲ ^a	۷/۴±/۳۲ ^a	۷/۲±/۴۰ ^a
	دوم	۷/۶±/۲۴ ^b	۲/۴±/۴۲ ^b	۳/۴±/۵۲ ^b	۳/۲±/۷۲ ^c	۲/۶±/۴۷ ^b	۲/۲±/۴۰ ^b	۷/۶±/۶۵ ^a	۷/۲±/۵۲ ^a
	سوم	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a	۷/۰±/۰ ^a

جراحات بافتی ریه اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

کلیمه: در گروه اول پرخونی و خونریزی و نکروز لوله‌های ادراری در روزهای ۲ تا ۱۰ بعد از تلقیح مشاهده گردید، که از روز ۸ به بعد نیز ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای‌ها دیده شد، بطوریکه ترمیم لوله‌های ادراری از ۱۰ روزگی شروع و در ۱۴ روزگی به حداکثر میزان خود رسید. در گروه دوم پرخونی و خونریزی و نکروز لوله‌های ادراری از روز ۲ تا ۱۲ بعد از تلقیح مشاهده گردید و در روز دوم به شکل نکروز شدید و گسترده و بتدریج از شدت آن کاسته شد، به طوری که در روز ۱۲ بشکل نکروز خفیف و کانونی دیده شد (تصویر ۵). شروع ترمیم لوله‌های ادراری در گروه همزمان از ۱۲ روزگی بود و در ۱۶ روزگی طبیعی بنظر می‌رسید. گروه‌های تیمار از نظر ضایعات بافتی کلیمه در روزهای ۶ تا ۱۴ پس از آزمایش با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$).

کبد: در گروه اول از روز ۴ تا ۱۲ بعد از تلقیح، ضایعات به شکل پرخونی سینوروئیدها و سیاهرگ مرکزی و تعدادی کانون‌های ارتشاح تک‌هسته‌ای بود. در گروه دوم عمده‌ترین ضایعه مشاهده شده از روز ۲ بعد از تلقیح، پرخونی در سینوروئیدها و سیاهرگ مرکزی و در برخی موارد کانون‌های ارتشاح تک‌هسته‌ایها در پارانشیم کبد و اطراف عروق بود (تصویر ۶). براساس مقایسه آماری بین دو گروه تیمار در روزهای ۲، ۶ و ۸ پس از آزمایش از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در کبد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$).

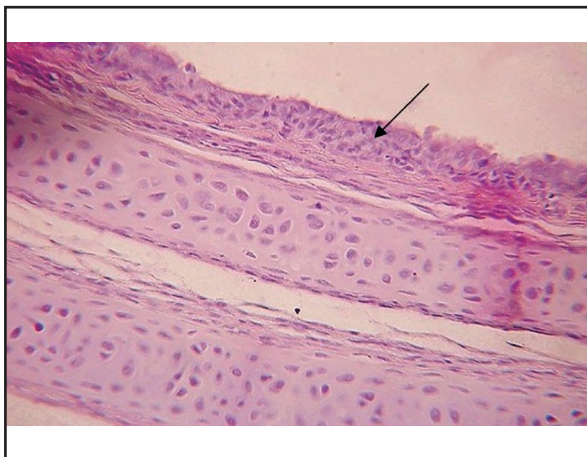
بورس فابریسیوس: در گروه اول تنها در روزهای ۲ تا ۱۲ بعد از تلقیح، تخلیه خفیف لنفوسیت‌های فولیکول‌های لنفاوی دیده شد. در گروه دوم کمی تخلیه لنفوسیت‌های فولیکول‌های لنفاوی و در مواردی کمی آتروفی فولیکول‌ها از روزهای ۲ تا ۱۶ مشاهده گردید (تصویر ۷). در جوجه‌های تلف شده علائم تخلیه لنفوسیت‌های فولیکول‌های لنفاوی همراه با نکروز

گروه‌های آزمایشی به شرح ذیل می‌باشد. هیچ گونه تغییرات پاتولوژیک در بافت‌های گروه کنترل در طول مطالعه مشاهده نگردید. تصاویر میکروسکوپ نوری تعدادی از بافت‌های گروه آزمایشی اول و دوم در تصاویر ۷ تا ۱۲ نشان داده شده است.

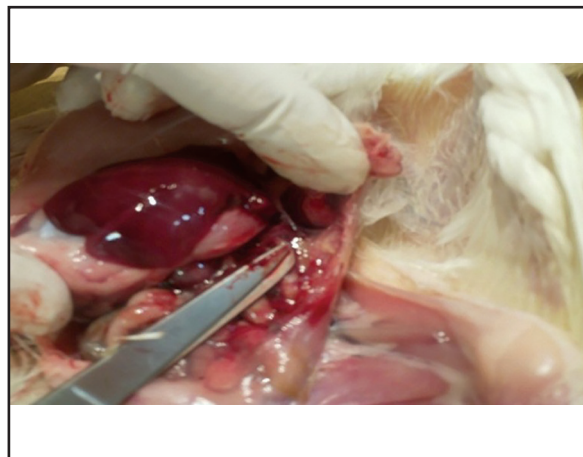
نای: در گروه اول در روزهای ۲ تا ۸ پس از تلقیح پرخونی، ریزش مژک‌ها و انفصال سلول‌های بافت پوششی و از روز ۶ بعد از تلقیح هیپرپلازی بافت پوششی مشاهده گردید (تصویر ۲) که از روز ۱۰ آزمایش نای طبیعی بنظر می‌رسید. در گروه دوم از روزهای ۲، ۴ و ۶ بعد از تلقیح علائم تورم نای (Trachitis) با از دست دادن مژه‌ها، کنده شدن و نکروز مخاط همراه با ارتشاح تک‌هسته‌ایها در زیر مخاط و همچنین هیپرپلازی مخاط دیده شد که از روز ۸ آزمایش نای ترمیم گردید و در روز ۱۲ به حداکثر میزان خود رسید. در جوجه‌های تلف شده (بویژه جوجه تلف شده روز دوم) علائم تورم نای چرکی با پرخونی شدید، ادم زیر مخاطی و اکسودای چرکی در مجرا و ارتشاح هتروفیل‌ها در زیر مخاط همراه با هیپرپلازی لایه اپیتلیال مشاهده گردید (تصویر ۳). براساس مقایسه آماری بین دو گروه تیمار در روزهای ۴ تا ۱۰ پس از تلقیح از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در نای اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$).

ریه: در گروه اول پرخونی و خونریزی کانونی در روزهای ۶-۲ بعد از تلقیح مشاهده شد، بعلاوه در روزهای ۶-۴ ادم نیز وجود داشت. همچنین پنومونی کانونی همراه با ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای و هتروفیل در روزهای ۲-۴ بعد از تلقیح دیده شد. در گروه دوم پرخونی، ادم اطراف عروقی همراه با نکروز و نشست فیبرین و ارتشاح تک‌هسته‌ای‌ها و کمی هتروفیل (پنومونی) در روزهای ۲ تا ۱۰ بعد از تلقیح مشاهده گردید (تصویر ۴)، که از روز ۱۲ بعد از تلقیح از شدت ضایعات کاسته شد (سیر بهبودی طولانی می‌باشد). در روزهای ۲ تا ۱۴ پس از آزمایش بین دو گروه تیمار از نظر

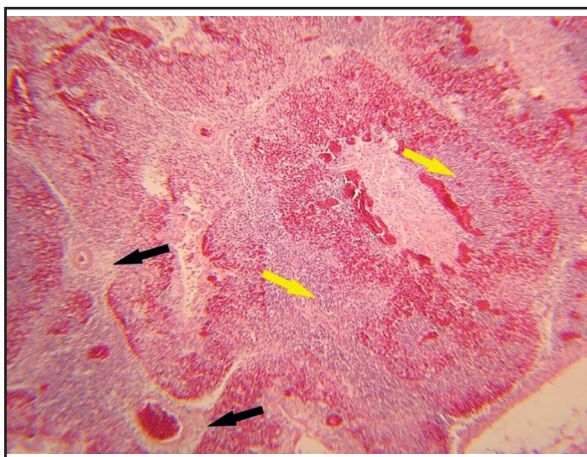




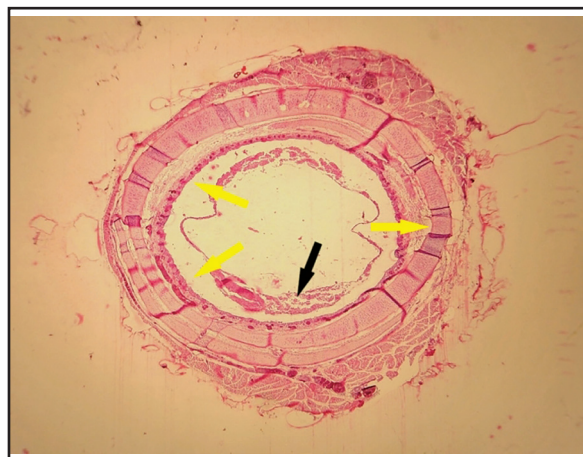
تصویر ۲. نای جوجه گروه آنفلوانزا- در روز ششم پس از تلقیح از بین رفتن مژدها و هیپرپلازی بافت پوششی (فلش) همراه با تشکیل بافت پوششی مطبق غیر متمایز قابل مشاهده است.



تصویر ۱. تورم و کدر شدن کیسه‌های هوایی در جوجه گروه همزمان آنفلوانزا و ORT در روز دوم پس از تلقیح.



تصویر ۴. ریه جوجه تلف شده گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز سوم پس از تلقیح پنومونی، پرخونی، ادم اطراف عروقی همراه با نکروز و نشت فیبرین (فلش‌های سیاه رنگ) و ارتشاح لکوسیت‌ها (فلش‌های زرد رنگ) دیده می‌شود.



تصویر ۳. نای جوجه تلف شده گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز دوم پس از تلقیح تورم نای، پرخونی، ادم (فلش زرد رنگ) و اکسودای چرکی در مجرا (فلش سیاه رنگ) مشاهده می‌شود.

تیموس بشکل پرخونی و نکروز لنفوسیت‌ها در بخش مرکزی همراه با ارتشاح خفیف هتروفیل‌ها بود. بین دو گروه تیمار در روزهای ۴ تا ۱۶ پس از تلقیح از نظر جراحات تیموس اختلاف معنی‌داری بود ($p < 0.05$).

لوزه‌های سکومی: در گروه اول از روزهای ۸ تا ۱۲ بعد از تلقیح، افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی مشاهده گردید. در گروه دوم از روز ۶ بعد از تلقیح کمی افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی مشاهده گردید. دو گروه تیمار در روزهای ۶ و ۱۰ تا ۱۶ پس از آزمایش از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در لوزه‌های سکومی اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$).

بحث

کمپلکس‌های تنفسی مهمترین بیماری‌هایی هستند (۱۸، ۴) که ماکیان به ویژه طیور صنعتی را درگیر می‌نمایند. این بیماری‌ها به واسطه تلفات سنگین، هزینه درمانی زیاد و کاهش میزان تولید ضررهای اقتصادی فراوانی به صنعت طیور وارد می‌کنند (۲۴، ۴). عوامل مختلف ویروسی

لنفوسیت‌ها و ارتشاح خفیف هتروفیل‌ها بود. گروه‌های تیمار از نظر جراحات بافتی بورس فابریسیوس در طول آزمایش بجز روز ۴ پس از تلقیح با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$).

طحال: در گروه اول از روز ۸ تا ۱۲ بعد از تلقیح، کمی افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی دیده شد. در گروه دوم از روز ۴ بعد از تلقیح، هیپرپلازی سلول‌های رتیکولوآندتلیال و از روز ۱۰ تا ۱۶ بعد از تلقیح افزایش فولیکول‌های لنفاوی مشاهده گردید. همچنین در جوجه‌های تلف شده روزهای ۲ و ۳ به ترتیب نکروز خفیف و شدید لنفوسیت‌ها همراه با ارتشاح هتروفیل وجود داشت. براساس مقایسه آماری بین دو گروه تیمار در روزهای ۴ تا ۱۶ پس از آزمایش از نظر جراحات بافتی ایجاد شده در طحال اختلاف آماری معنی‌داری بود ($p < 0.05$).

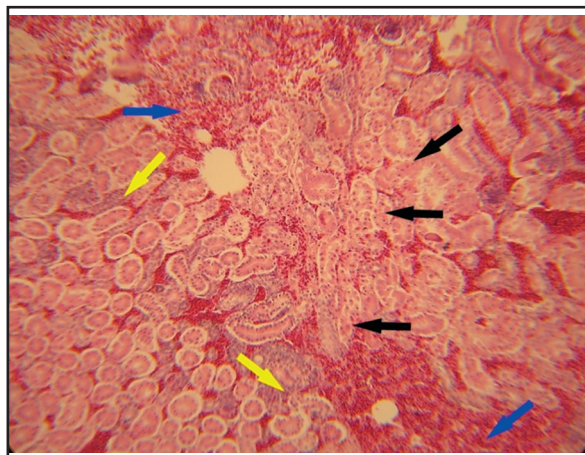
تیموس: در گروه اول در روزهای ۴ تا ۱۲ بعد از تلقیح، علائم پرخونی در بخش مرکزی ملاحظه گردید. در گروه دوم تنها کاهش خفیف لنفوسیت‌های بخش قشری مشاهده شد. در جوجه‌های تلف شده ضایعات



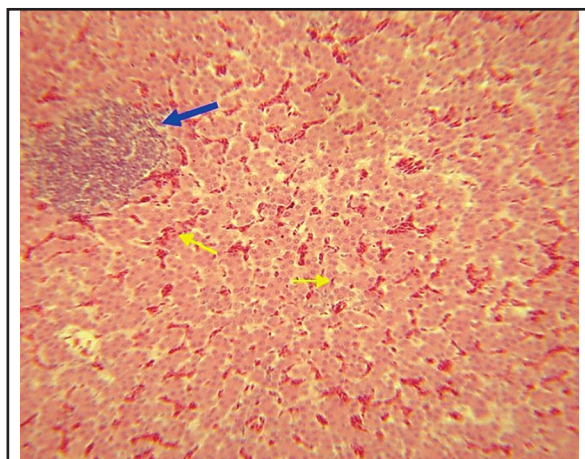
ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ و باکتری اورینتوباکتریوم رینوتراکتال از مهمترین عوامل بیماریزا هستند که در طی دهه‌های اخیر در گله‌های مبتلا به اختلالات شدی تنفسی و تلفات زیاد در کشور گزارش شدند (۴). اگرچه روند بیماریزایی و جراحات بافتی ویروس H₉N₂ آنفلوانزا و باکتری ORT توسط محققین مختلف بررسی گردیده است (۲۵، ۲۴، ۱۹، ۱۰، ۹، ۶، ۱). اما تا به حال هیچ گونه مطالعه‌ای در خصوص جراحات بافتی ناشی از این دو عامل بیماریزا به صورت عفونت همزمان در جوجه‌های SPF صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق جراحات هیستوپاتولوژی ناشی از ویروس H₉N₂ آنفلوانزا و باکتری اورینتوباکتریوم رینوتراکتال به صورت آلودگی همزمان مورد بررسی قرار گرفت.

Mo و همکاران در سال ۱۹۹۷، با تلقیح داخل نایی سوبه‌های ویروس آنفلوانزا با بیماریزایی کم (nHPAI) و زیاد (HPAI) به ماکیان، ضایعات ایجاد شده در اثر ویروس‌های nHPAI و آنتی ژن آن‌ها را در بافت‌های نای و ریه گزارش نمودند، همچنین این محققین نشان دادند که ویروس‌های HPAI موجب ایجاد جراحات نکروز و التهاب در بورس فابریسیوس، تیموس، طحال، قلب، پانکراس، کلیه، مغز، نای، ریه و عضلات اسکلتی در پرندگان عفونی می‌گردند، در حالی که ویروس‌های nHPAI تنها در نای و ریه جراحیاتی ایجاد می‌نمایند (۱۵). در یک مطالعه بدنبال تلقیح داخل نایی ویروس آنفلوانزای A/Chicken/Iran/۲۵۹/۱۹۹۸ (H₉N₂)، تراکئیت حاد همراه با احتقان، ادم، فقدان مژک‌ها و ریزش اپی‌تلیوم و ارتشاح هتروفیل‌ها و نکروز سلول‌های اپی‌تلیال در نای یک روز پس از تلقیح مشاهده گردید و در روزهای ۳، ۶ و ۱۰ پس از تلقیح نیز علائم التهاب لمفوسیتی در نای همراه با ارتشاح لمفوسیت‌ها، فقدان مژک‌ها و هیپرپلازی اپی‌تلیوم نیز وجود داشت و مهمترین تغییرات هیستوپاتولوژیک در روزهای ۱ تا ۱۰ پس از تلقیح ارتشاح لمفوسیت‌ها در زیرمخاط برونش‌های ثانویه و پنومونی گزارش شد (۱۱) و در مطالعه دیگر با تلقیح داخل وریدی همان ویروس H₉N₂ علی‌رغم نبود جراحات بافتی در نای و ریه جوجه‌های عفونی در روزهای ۱، ۶ و ۱۰ پس از تلقیح، فقط ارتشاح ملایم لمفوسیت‌ها در زیر مخاط برونش‌های ثانویه در روز ۳ پس از تلقیح دیده شد (۱۰). Hadipour در سال ۲۰۱۰، متعاقب تلقیح ویروس H₉N₂ در جوجه‌های تجاری نژاد راس، التهاب حاد نای همراه با ادم، پرخونی، دژنراسیون غدد مخاطی، ارتشاح هتروفیل‌ها در روز ۲ پس از تلقیح و التهاب لمفوسیتی نای، همراه با ارتشاح لمفوسیت‌ها، فقدان مژک‌ها و هیپرپلازی اپی‌تلیوم تا روز ۱۱ پس از تلقیح را گزارش نمودند. همچنین در این تحقیق مهمترین تغییرات هیستوپاتولوژی ریه از روزهای ۴ تا ۱۱ پس از تلقیح شامل ارتشاح لمفوسیت‌ها در بافت پارین برونش‌های ثانویه و پنومونی بود (۱۲).

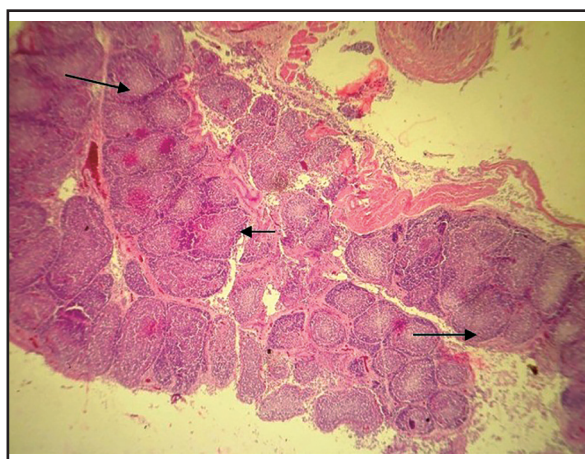
Banani و همکاران در سال ۲۰۰۰، بدنبال تلقیح باکتری ORT در جوجه‌های گوشتی، در نای تراکئیت همراه با پرخونی، ادم، هیپرپلازی بافت پوششی و ارتشاح سلول‌های آماسی و در ریه پنومونی فیبرینی چرکی،



تصویر ۵. کلیه جوجه تلف شده گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز سوم پس از تلقیح نفریت، پرخونی، خونریزی (فلش‌های آبی رنگ) و نکروز لوله‌های ادراری (فلش‌های سیاه رنگ) و ارتشاح کانونی لکوسیت‌ها (فلش‌های زرد رنگ) مشاهده می‌شود.



تصویر ۶. کبد جوجه تلف شده گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز دوم پس از تلقیح پرخونی در سینوزوئیدها (فلش‌های زرد رنگ) و یک کانون نسبتاً بزرگ ارتشاح تک هسته‌ای در پارانشیم کبد (فلش آبی رنگ) دیده می‌شود.



تصویر ۷. بورس فابریسیوس جوجه گروه همزمان آنفلوانزا و ORT- در روز شانزدهم پس از تلقیح تخلیه لنفوسیت‌های فولیکول‌های لنفاوی (فلش‌های سیاه رنگ) مشاهده می‌شود.

و باکتریایی می‌توانند در ایجاد سندرم‌های تنفسی نقش داشته باشند که



Swayne and Slemons در سال ۱۹۹۰، در یک مطالعه تجربی با تلقیح داخل وریدی ویروس های nHPAI، جراحات کلیه شامل نکروز شدید لوله های ادراری و نهایتاً مرگ و میر جوجه های عفونی را گزارش نمودند (۲۰). مطالعات هیستوپاتولوژیکی و ایمنوهیستوپاتولوژیکی با ویروس های nHPAI نشان داد که نکروز توبول های کلیوی به ویژه لوله های پروگزیمال مرتبط با تکثیر ویروس H₉N₂ می باشد (۲۳). در تحقیق دیگر پس از تلقیح داخل وریدی ویروس H₉N₂ (A/Mallard/Ohio/۱۸۴/۸۶) به جوجه های SPF در هیستوپاتولوژی کلیه علامی از قبیل نفریت هتروفیلی چندکانونی بینابینی توبولی و نفریت بینابینی فیروزه همراه با آتروفی مجاری و ارتشاح کانونی تا منتشر لمفوسیت های بینابینی مشاهده گردید (۲۲). در مطالعات صورت گرفته توسط Hablolvarid و همکاران در سال های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴، ضایعات هیستوپاتولوژیک کلیه مرتبط با ویروس آنفلوانزای (H₉N₂) عفونی شده به روش های داخل بینی و داخل وریدی را نفریت لمفوسیتی بینابینی لوله های ادراری و نفریت هتروفیلی بینابینی توبولی همراه با نکروز اپی تلیوم مجاری تا روز ۳ پس از تلقیح گزارش نمودند (۱۱، ۱۰). Thachil و همکاران در سال ۲۰۰۹، نفریت لمفوسیتی بینابینی همراه با کست های معدنی شده در لوله های ادراری گروه های همزمان IBV+ORT و IBV+E.coli+ORT مشاهده کردند (۲۴). احتقان، نفریت بینابینی کانونی غیرچرکی به همراه نکروز و رسوب اورات در کلیه ها در اثر عفونت همزمان ویروس H₉N₂ با باکتری MG نیز مشاهده شده است (۱۹). Bano و همکاران در سال ۲۰۰۳، با تلقیح جدایی A/chicken/Pakistan/۳۱/۰۱ (H₉N₂) ویروس آنفلوانزا به ماکیان و آلودگی همزمان با برونشیت عفونی، اورنیتوباکتریم راینوتراکتال و شریشیا کلی گزارش کردند که ویروس آنفلوانزا به تنهایی، فقط قادر به تکثیر و ایجاد ضایعات در سلول های بافت پوششی سیستم تنفسی می باشد، اما در گروه های همزمان به غیر از نای و ریه ها در سایر بافت ها نظیر کلیه و بورس فابریسیوس نیز جراحات ایجاد می کند (۶)

در مطالعه حاضر پرخونی و خونریزی و نکروز لوله های ادراری در گروه های عفونی مشاهده گردید که همراه با ارتشاح سلول های تک هسته ای ها بود. یافته های گروه آنفلوانزای تحقیق حاضر با نتایج مطالعات پیشین (۲۳، ۲۲، ۲۰، ۱۱، ۱۰) دارای همخوانی می باشد و نشان دهنده شدید و طولانی بودن ضایعات بافت کلیه گروه همزمان نسبت به گروه آنفلوانزا است که این یافته گروه همزمان مطالعه حاضر با نتایج Pazani و همکاران در سال ۲۰۰۸، Bano و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Costa-Hurtado و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطابق دارد (۶، ۸، ۱۹). به نظر می رسد عفونت های همزمان باعث تشدید شدن جراحات بافتی کلیه ها می شود.

Banani و همکاران در سال ۲۰۰۰، بدنال عفونت تجربی با باکتری ORT در جوجه های گوشتی دژنرسانس و نکروز انعقادی در بافت کبد

پرخونی، نکروز و نفوذ هتروفیل ها و سلول های تک هسته ای به همراه تجمع اکسودا در پارابرونشها گزارش نمودند (۳). Pazani و همکاران در سال ۲۰۰۸، تأثیر ویروس H₉N₂ (۱۷۳/۹۹) A/Chicken/Tehran/ را در جوجه های تجاری مایکوپلازما گالی سپتیکوم (MG) مثبت و منفی بدنال تلقیح داخل وریدی و یا همزمان داخل وریدی و داخل نای و چشمی از لحاظ هیستوپاتولوژی مقایسه کردند، نتایج این پژوهشگران نشان دهنده ارتشاح سلول های التهابی تک هسته ای در بافت پارین نای، برونش های ثانویه، ریه و کیسه های هوایی بود (۱۹). در مطالعه دیگر در مرغان تخم گذار SPF نژاد لگهورن، جراحات بافت نای گروه عفونت همزمان با ویروس برونشیت عفونی و باکتری شریشیا کلی که تحت آلودگی ثانویه با باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال بودند (IBV+E.coli+ORT)، نسبت به گروه های انفرادی برونشیت عفونی (IBV)، شریشیا کلی (E.coli) و اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) و گروه های همزمان برونشیت عفونی و شریشیا کلی (IBV+E.coli)، و برونشیت عفونی و اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (IBV+ORT) به مراتب شدیدتر بود، همچنین مهمترین ضایعات هیستوپاتولوژی ریه در گروه های همزمان شامل نکروز و ارتشاح سلول های تک هسته ای به همراه اکسودای فیبرینی در زیر مخاط برونش های ثانویه بود (۲۴). Pan و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که عفونت همزمان ویروس H₉N₂ آنفلوانزا با ORT در جوجه های گوشتی نه تنها موجب تشدید نشانه های بالینی و جراحات کالبدگشایی ناشی از ویروس آنفلوانزا می شود، بلکه سبب افزایش تلفات تا میزان ۶۰٪ نیز می گردد (۱۸). Costa-Hurtado و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه تجربی با تلقیح ویروس های آنفلوانزا و نیوکاسل به صورت جداگانه و همزمان به جوجه ها و بوقلمون های SPF اقدام به بررسی بیماریزایی و جراحات میکروسکوپی کردند و گزارش نمودند که جراحات پاتولوژی گروه همزمان نسبت به عفونت های جداگانه شدید می باشد، همچنین این مطالعات نشان داد جراحات هیستوپاتولوژی ناشی از گروه همزمان در بافت های پوششی نای، ریه، کلیه و بورس فابریسیوس شدید و طولانی مدت می باشد (۸).

در مطالعه حاضر در گروه های آزمایشی ریزش مزکها، پرخونی و هیپرپلازی مخاط همراه با ارتشاح تک هسته ای ها در زیر مخاط نای و خونریزی، ادم، پنومونی همراه با ارتشاح تک هسته ای ها و هتروفیل ها در زیر مخاط برنش های ثانویه ریه مشاهده گردید که در گروه همزمان نسبت به گروه آنفلوانزا با شدت بیشتر و سیر طولانی تری تا بهبودی همراه بود. یافته های بدست آمد از ضایعات نای و ریه گروه آنفلوانزا با نتایج حاصل از مطالعات Hablolvarid و همکاران در سال ۲۰۰۴، Mo و همکاران در سال ۱۹۹۷ و Swayne and Slemons در سال ۱۹۹۴ همخوانی دارد (۲۳، ۱۵، ۱۱). افزایش شدت ضایعات در ارگان های تنفسی گروه همزمان بیانگر این موضوع است که ORT بعنوان عفونت ثانویه در تشدید جراحات بافتی ویروس آنفلوانزا نقش بسزایی دارد.



References

- Alexander, D. J. (2007) Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. *Avian Dis.* 51(s1): 161-166.
- Azizpour, A., Goudarzi, H., Charkhkar, S., Momayez, R., Hablolvarid, M. H. (2014) Experimental study on tissue tropism and dissemination of H9N2 avian influenza virus and *Ornithobacterium rhinotracheale* co-infection in SPF chickens. *J Anim Plan Sci.* 24(6):1655-1662.
- Banani, M., Khaki, P., Goudarzi, H., Vand-Yousefi, J., Pourbakhsh, S.A. (2000) Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a broiler and a pullet flock. *Pajouhesh Va Sazandegi.* (In Persian) 46: 106-109.
- Banani, M., Momayez, R., Pourbakhsh, S.A., Goodarzi, H., Bahmani Nejad, M.A. (2002) Simultaneous isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* and avian influenza virus subtype H9N2 from commercial poultry. *Iran J Vet Res.* 3(2): 100-115.
- Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Ghodsian, N., Karimi, V., Ashtari, A. (2011) The phylogenetic analysis of some *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chicken flocks in Iran. *GenBank:* JF810491.
- Bano, S., Naeem, K., Malik, S.A. (2003) Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in Chickens. *Avian Dis.* 47(3 Suppl): 817-822.
- Bijanadz, P., Momayez, R., Bozorgmehrfard, M.H., Hablolvarid, M.H., Pourbakhsh, S.A. (2013) Experimental study on histopathological changes and tissue tropism of iranian infectious bronchitis serotype 793/B-Like virus in spf chickens. *J South Afr Vet Assoc.* 84 (1): 1 -7.
- Costa-Hurtado, M., Afonso, C.L., Miller, P.J., Spackman, E., Kapczynski, D.R., Swayne, D.E., Shepherd, E., Smith, D., Zsak, A., Pantin-Jackwood. (2014) Virus interference between H7N2 low pathogenic avian influenza virus and lentogenic Newcastle disease virus in experimental co-infections in chickens and turkeys. *Vet Res.* 45:1
- Goudarzi, H., Azizpour, A., Banani, M., Nouri,

چوجه تلف شده گزارش نمودند (۳). طبق مطالعات Thachil و همکاران در سال ۲۰۰۹، در گروه‌های همزمان IBV+E.coli+ORT و IBV+ORT، کبد ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای و رسوب فیبرین در اطراف ورید مرکزی وجود داشت و در طحال نیز میزان متوسط تا شدید تخلیه لنفاوی و رسوب فیبرین مشاهده گردید (۲۴). آتروفی لمفوئیدی و فولیکول‌های کیستیک در بورس فابریسیوس (۱۲، ۱۰)، تخلیه لمفوسیتی در بخش قشری بافت تیموس در روزهای ۱ و ۱۰ پس از تلقیح (۱۱) و روزهای ۶ و ۱۱ پس از تلقیح (۱۲) و حضور نوکلئوپروتئین ویروس در لوزه‌های سکومی در روز ۳ پس از تلقیح (۱۱) در آلودگی با ویروس H₉N₂ گزارش شده است. طبق مطالعات Hablolvarid و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Hadipour در سال ۲۰۱۰، طحال بیشترین تغییرات هیستوپاتولوژیک را در بین بافت‌های لمفوئیدی داشت که شامل هیپرپلازی سلول‌های رتیكلوآندوتلیال و افزایش تعداد فولیکول‌های لمفوئیدی به ترتیب در روزهای ۳ و ۱۰ پس از تلقیح ویروس H₉N₂ و روزهای ۱ و ۱۱ پس از تلقیح ویروس H₉N₂ بود (۱۲، ۱۱). در جوجه‌های تجاری مبتلا به عفونت مایکوپلاسما گالی سپتیکوم (MG) با تلقیح داخل وریدی و یا همزمان داخل وریدی و داخل بینی و چشمی 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 رتیكلوآپتیلیال و میوسیت‌ها در مدولای لوب‌های تیموس گزارش شد (۱۹).

در مطالعه حاضر در گروه‌های عفونی، پرخونی سینوروئیدها و سیاهرگ مرکزی همراه با ارتشاح تک‌هسته‌ای‌ها در کبد، تخلیه لنفوسیتی فولیکول‌های لنفاوی در بورس فابریسیوس، افزایش تعداد فولیکول‌های لنفاوی همراه با نکروز و ارتشاح خفیف هتروفیلها در طحال، پرخونی و ارتشاح خفیف هتروفیل‌ها در بخش مرکزی تیموس و افزایش فولیکول‌های لنفاوی در لوزه‌های سکومی مشاهده گردید که یافته‌های گروه آنفلوانزا با نتایج مطالعات محققین (۲۴، ۱۲، ۱۱، ۱۰) همخوانی دارد. در گروه همزمان در مقایسه با گروه آنفلوانزا جراحات هیستوپاتولوژی کبد و بافت‌های لنفوئیدی زودتر ایجاد و مدت زمان بیشتری ادامه داشته است و همچنین از شدت بیشتری برخوردار بود که این یافته مطالعه حاضر با گزارشات پیشین عفونت‌های همزمان (۲۴، ۱۹، ۱۸، ۸، ۶، ۴) همسو می‌باشد. نتیجه‌گیری نهایی: نتایج این مطالعه نشان داد که آلودگی همزمان ویروس H₉N₂ آنفلوانزا با باکتری ORT سبب تشدید جراحات بافتی ناشی از ویروس H₉N₂ آنفلوانزا می‌شود.

تشکر و قدرانی

نویسندگان مقاله وظیفه خود می‌دانند از آقایان دکتر عباس نوری و دکتر منصور بنانی اساتید ارجمند موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج به خاطر مساعدت در اجرای این پژوهش، کمال تشکر و قدرانی نمایند.



- A., Seifi, S. (2015) Survey of tissue tropism and dissemination of ORT-R87-7/1387 strain of *Ornithobacterium rhinotracheale* in SPF chickens. Pajouhesh Va Sazandegi. (In Persian) 27: 2-8.
10. Hablolvarid, M. H., Sohraby Haghdost, I., Pourbakhsh, S. A., Gholami, M. R. (2003) Study on histopathologic changes in chicken following intravenous inoculation with avian influenza virus a/chicken/Iran/259/1998(H9N2). Arch Razi Inst. 55(1): 41-54.
11. Hablolvarid, M. H., Sohraby Haghdost, I., Pourbakhsh, S. A., Gholami, M. R. (2004) Histopathological study of intranasally inoculated a/chicken/Iran/259/1998(H9N2) Influenza Virus in Chicken. Arch Razi Inst. 58: 51-62.
12. Hadipour, M.M., Farjadian, S.H., Azad, F., Kamravan, M., Dehghan, A. (2011) Nephropathogenicity of H9N2 avian influenza virus in commercial broiler chickens following intratracheal inoculation. J Anim Vet Adv. 10(13):1706-1710.
13. Haghghat-Jahromi, M., Asasi, K., Nili, H., Dadras, H., Shooshtari, A.H. (2008) Coinfection of avian influenza virus (H9n2 Subtype) with infectious bronchitis live vaccine. Arch Virol. 53(4): 651-655.
14. Mosleh, N., Dadras, H., Mohammadi, A. (2009) Evaluation of H9N2 avian influenza virus dissemination in various organs of experimentally infected broiler chickens using RT-PCR. Iranian J Vet Res. 10(1): 12-20.
15. Mo, I.P., Brugh, M., Fletcher, O. J., Rowland, G. N., Swayne, D.E. (1997) Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. Avian Dis. 41(1): 125-136.
16. Naeem, K., Ullah, A., Manvell, R.J., Alexander, D.J. (1999) Avian influenza a subtype H9H2 in poultry in pakistan. Vet Rec. 145(19): 560-565.
17. Nili, H., Asasi, K. (2003) Avian influenza (H9n2) outbreak in Iran. Avian Dise. 47(3 Suppl): 828-831.
18. Pan, Q., Liu, A., Zhang, F., Ling, Y., Ou, C., Hou, N., He, C. (2012) Co-infection of broilers with *Ornithobacterium rhinotracheale* and H9N2 avian influenza virus. BMC. Vet Res. 8:104. doi:10.1186/1746-6148-8-104.
19. Pazani, J., Vasfi-Marandi, M., Ashrafihelan, J., Marjanmehr, S. H., Ghods, F. (2008) Pathological studies of a / chicken / Tehran / Zmt - 173/99 (H9N2) influenza virus in commercial broiler chickens of Iran. Inter J Poul Scie. 7: 55-63.
20. Slemons, R. D., Swayne, D. E. (1990) Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. Avian Dis. 34(2): 277-284.
21. Swayne, D.E., Suarez, D.L., Sims, L.D. (2013) Influenza. In: Diseases of Poultry. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Venugopal, N. (eds.). (13th ed.) Wiley-Blackwell, Ames, USA. p. 181-218.
22. Swayne, D. E., Slemons, R. D. (1990) Renal pathology in specific-pathogen-free chickens inoculated with a waterfowl-origin type a influenza virus. Avian Dis. 34(2): 285 -294.
23. Swayne, D. E., Slemons, R. D. (1994) Comparative pathology of a chicken-origin and two duck-origin influenza virus isolates in chickens: the effect of route of inoculation. Vet Pathol. 31(2): 237-245.
24. Thachil, A.J., Velayudhan, B.T., Shaw, D.P., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V. (2009) Pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* in egg-laying hens with coexisting infectious bronchitis virus and *Escherichia coli* infections. J Appl Poult Res. 18:780-788.
25. Van Empel, P., Hafez, H.M. (1999) *Ornithobacteriumrhinotracheale*: a review. Avian Dis. 28: 217- 227.
26. Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri Fard, M. H. (2002) Isolation of H9N2 subtybe of avian influenza viruses during outbreak in chickens in Iran. Iran Biomed J. 6: 13-17.



An Experimental Study of Histopathological Lesions Caused by H9N2 Subtype of Avian Influenza Virus and *Ornithobacterium Rhinotracheale* Co-Infection

Azizpour, A.^{1*}, Goudarzi, H.², Charkhkar, S.³, Momayez, R.², Hablolvarid, M.H.³, Bijanzad, P.³

¹Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

²Department of Avian Diseases Research and Diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

³Department of Poultry Diseases, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴Department of Pathology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

⁵Department of Clinical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

(Received 4 February 2018, Accepted 12 May 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Avian influenza virus H9N2 subtype and *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) causes histopathological lesions in birds. Yet, there is not any study on tissue lesions caused by these pathogens co-infection in specific pathogen free (SPF) chicks. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the type, severity and extent of histopathological lesions induced by co-infection of H9N2 subtype avian influenza virus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in SPF chickens. **METHODS:** Sixty, one-day-old SPF chicks were divided randomly into three groups of twenty. At 21 days, the chicks in the first group were infected with H9N2 subtype AI virus and the second group was inoculated with H9N2 subtype AI virus and ORT simultaneously. The third group was inoculated with PBS as control. Then, three birds from each group were randomly selected and euthanized and autopsied at 2 till 16 days post-inoculation (DPI). The tissue samples were collected from trachea, lungs, liver, spleen, thymus, kidneys, cecal tonsil and bursa of fabricius. They were cut into 5 to 6 μ m thickness sections using paraffin embedding method and were stained by Hematoxylin and Eosin (H&E). **RESULTS:** The severity of histopathological lesions in the second group was higher than first group. Tissue changes were not observed in control group. **CONCLUSIONS:** The results of this study showed that infected chickens with H9N2 subtype AI virus and ORT simultaneously cause exacerbated histopathological lesions compared to H9N2 subtype of AI virus.

Keyword: Avian influenza virus, ORT, histopathological lesions, SPF chickens

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Histopathological lesions of the trachea, lung, kidney and liver in 3 groups.

Table 2. Histopathological lesions of bursa of fabricius, spleen, thymus and cecal tonsil in 3 groups.

Figure 1. Air sacculitis in the bird of co-infection group on day 2 PI.

Figure 2. Hyperplasia of the connective tissue in trachea of co-infection group on day 6 PI.

Figure 3. Congestion, edema and exudative fibrin in the duct in trachea of died bird of co-infection group on day 2 PI.

Figure 4. Pneumonia, congestion and edema associated with necrosis and infiltration of leukocytes in lungs of died bird of co-infection group on day 3PI.

Figure 5. Congestion, hemorrhage and nephrit, urinary tracts necrosis and infiltration of leukocytes in kidney of died bird of co-infection group on day 3PI.

Figure 6. Congestion in sinusoidal and mononuclear infiltration in parenchyma in liver of died bird of co-infection group on day 2 PI.

Figure 7. Lymphocyte depletion of follicles in bursa of fabricius in bird of co-infection group on day 16 PI.



*Corresponding author's email: aidin_azizpour@uma.ac.ir, Tel: 045-32545621, Fax: 045-32545623