دوفصلنامه طب جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکي خليج فارس
مرکز تحقیقات طب گرمسیري و عفوني خليج فارس
دانشگاه علوم پزشکي و خدمات بهداشتي درماني بوشهر
سال دهم، شماره ۲، صفحه ۱۲۷- ۱۱۹ (اسفند ۱۳۸۶)

بررسی جراحات و تروپیسم بافتي ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 در ماکیان گوشتی

دکتر محمد مهدی هادی‌پور*[۱]، دکتر حسن نیلی[۲]، دکتر کرامت اساسی[۲]، دکتر شیرین فرجادیان[۳]

[۱] دکترای تخصصی بیماري‌های طیور، مرکز تحقیقات طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
[۲] دانشیار بیماري‌های طیور، مرکز تحقیقات طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
[۳] استادیار ایمونولوژی، بخش ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

چکیده

زمینه: ویروس آنفلوانزاي طیور تحت تیپ (H9N2) علاوه بر ایجاد خسارات اقتصادي زیاد در صنعت طیور کشورهاي منطقه خاورمیانه، از نظر بهداشت عمومي نیز داراي اهمیت مي‌باشد. هدف از این تحقیق، بررسي اثرات پاتولوژیك ویروس آنفلوانزا تحت تیپ (H9N2) در اندام-هاي مختلف ماکیان گوشتي و ردیابي آنتي‌ژن ویروس در این اندام‌ها است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰ قطعه جوجه گوشتي یک روزه نژاد راس در دو گروه (آزمایش و شاهد) تقسیم و در روزهاي ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۱ پس از تلقیح ویروس، عیار پادتن اختصاصي تحت تیپ (H9N2) در سرم آن‌ها تعیین و سپس اقدام به نمونه‌برداري از بافت‌هاي ناي، ریه، کلیه، طحال، تیموس، بورس فابریسیوس، دوازدهه، پانکراس، کبد و مغز جهت انجام مطالعات هیستوپاتولوژي و ایمونوفلورسانس گردید.

یافته‌ها: میانگین عیار آنتي‌بادي در جوجه‌هاي گروه آزمایش در روزهاي ذکر شده به ترتیب ۳، ۲/۴، ۱/۷، ۳/۳، ۴/۲ و ۵/۶ و در جوجه‌هاي گروه شاهد به ترتیب ۳، ۲/۷، ۲/۳۴، ۱/۸، ۱/۲۴ و ۰ بود. تراکئیت، پنوموني، نفریت، هیپرپلازي لنفوئید در طحال و دوازدهه، تخلیه لنفوسیتي در تیموس، آتروفي لنفاوي در بورس فابریسیوس، ارتشاح لنفوسیتي و واکوئوله شدن سلول‌ها در پانکراس از یافته‌هاي هیستوپاتولوژي بودند. حضور آنتي ژن ویروس در بافت‌هاي ناي، ریه و کلیه جوجه‌هاي تلقیح شده با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسانس غیر مستقیم به اثبات رسید.

نتیجه‌گیري: ویروس آنفلوانزاي طیور تحت تیپ (H9N2) ویروسي کم بیماري‌زا است که در ماکیان ویژگي اپي تلیوتروپیک دارد و داراي تمایل بافتي نسبت به دستگاه تنفس (پنوموتروپیک) و کلیه جوجه (نفروتروپیک) مي‌باشد.

واژگان کلیدي: آنفلوانزای طیور، ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2، ماکیان گوشتي، هیستوپاتولوژی

دریافت مقاله:۱۳۸۶/۴/۵ - پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۱۱/۴

* شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده دامپزشکی
Email: hadipourmm@yahoo.com

مقدمه

آنفلوانزاي طيور يک بيماري ويروسي است که توسط تيپ A ويروس‌هاي آنفلوانزا ايجاد مي‌شود. ويروس آنفلوانزاي پرندگان در خانواده ارتوميکسوويريده قرار داشته و داراي ۱۶ آنتي‌ژن هماگلوتينين و ۹ آنتي‌ژن نورآمينيداز مي‌باشد و بر اين اساس به بيش از ۱۴۴ تحت تيپ و همچنين بر اساس شاخص‌هاي آنتي‌ژني پروتئين‌هاي نوکلئوپروتئين و ماتريکس به سه تيپ A، B و C و با توجه به توانايي ايجاد مرگ و مير در ماکيان به دو پاتوتيپ بسيار بيماري‌زا و با بيماري‌زايي کم تقسيم مي‌شود (۶-۱). فقط ويروس‌هاي تيپ A مي‌توانند در پرندگان ايجاد عفونت طبيعي نمايند (۳ و ۷). دامنه وسيعي از حدت در ويروس‌هاي تيپ A آنفلوانزاي طيور وجود دارد که از يک عفونت بدون علائم باليني تا ظهور صددرصد تلفات در پرندگان حساس متغير مي‌باشد (۳ و ۷).

ويروس تحت تيپ H9N2 آنفلوانزا به عنوان يك ويروس با حدت کم شناخته شده است ولي گزارشات متعددي از شيوع آن در اواخر سال‌هاي دهه ۱۹۹۰ از نقاط مختلف جهان پرسش‌هاي متعددي در اذهان محققين ايجاد کرده است. جداسازي آن از خوک‌هاي وحشي و همچنين از موارد وقوع آنفلوانزاي انساني، اهميت اين تحت تيپ را بيشتر کرده است (۱۳-۸). پس از درگير شدن صنعت طيور کشور به شيوع آنفلوانزا با اين تحت تيپ در سال ۱۳۷۷، اين صنعت متحمل خسارات اقتصادي سنگيني از جمله ايجاد تلفات تا ۶۰ درصد در مزارع ماکيان گوشتي شد. پس از جداسازي ويروس و انجام آزمايش‌هاي بيماري‌زايي در ماکيان عاري از پاتوژن‌هاي خاص, مشخص شد که اين ويروس يك پاتوتيپ با بيماري‌زايي کم مي‌باشد (۱۰ و ۱۱). گزارشات بدست آمده از همه‌گيري‌هاي اخير آنفلوانزاي طيور حاکي از آن است که ويروس‌هاي آنفلوانزا با بيماري‌زايي کم ممکن است در اثر موتاسيون تبديل به ويروس‌هاي بسيار بيماري‌زا گردند (۱۴ و ۱۵) که در اين صورت خطر بالقوه‌اي براي صنعت طيور محسوب مي‌شوند. تحقيقات مختلفي در کشور بر روي اين تحت تيپ از ويروس آنفلوانزا انجام گرفته است (۱۰، ۱۱ و ۱۶). با توجه به کمبود اطلاعات درباره اين تحت تيپ از ويروس آنفلوانزا، انجام تحقيقات تکميلي ضروري به نظر مي‌رسد.

تحقيق حاضر در اين راستا طراحي شده است و مي‌کوشد تا بيماري‌زايي ويروس آنفلوانزاي H9N2 جدا شده از ايران به دنبال تلقيح داخل بيني اين ويروس در ماکيان گوشتي را در شرايط کنترل شده ارزيابي کرده و نوع، شدت و ميزان جراحات هيستولوژيک در بافت‌هاي مختلف ماکيان گوشتي تلقيح شده با اين ويروس و حضور آنتي ژن ويروس در بافت‌هاي مختلف (تروپيسم بافتي ويروس) را مطالعه نمايد.

مواد و روش‌کار

الف- روش آزمايش

تعداد ۵۰ قطعه جوجه گوشتي يک روزه نژاد راس (خريداري شده از مجتمع طيور فارس) به دو گروه مساوي تقسيم شدند (گروه آزمايش و گروه شاهد) و در مکان‌هاي مجزا ولي با شرايط يکسان پرورش يافتند. روزانه وضعيت سلامتي و نشانه‌هاي باليني جوجه‌ها تحت نظر قرار گرفت و نتايج آن ثبت شد. در سن ۲۰ روزگي، جوجه‌هاي گروه آزمايش با ويروس آنفلوانزا تحت تيپ (H9N2)، (۱۲) به روش داخل بيني با دوزي معادل 10^{6} EID_{50}[1] به ازاي هر

[1] embryo infective dose

پرنده (۰/۱ ميلي‌ليتر) تلقيح شدند. جهت تعيين عيار پادتن اختصاصي آنفلوانزا تحت تيپ (H9N2)، از تمامي جوجه‌هاي هر دو گروه، در روزهاي ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۱ پس از تلقيح ويروس، خون‌گيري از سياهرگ بالي به عمل آمد و سپس نمونه‌هاي سرمي با تست ممانعت از هماگلوتيناسيون مورد بررسي قرار گرفتند.

در روزهاي ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و۱۱ پس از تلقيح، هر بار ۳ قطعه جوجه از گروه آزمايش و ۳ قطعه جوجه از گروه شاهد بصورت تصادفي انتخاب و به روش انساني كشته و كالبد گشايي گرديدند. سپس نمونه‌برداري از بافت‌هاي ناي، ريه، كليه، طحال، تيموس، بورس فابريسيوس، دوازدهه، پانكراس، كبد و مغز انجام گرفت.

نمونه‌ها به دو قسمت تقسيم شد. يک قسمت از نمونه‌ها به منظور آزمايش هيستوپاتولوژي در فرمالين بافر ۱۰ درصد قرار داده شد. قسمت ديگري از نمونه‌ها به منظور انجام آزمايش ايمونوفلورسانس غيرمستقيم تا موقع انجام آزمايش، در فريزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداري شد.

ب- آزمايش هيستوپاتولوژي

پس از ثبت ضايعات عمومي لاشه‌ها، نمونه‌هاي بافتي از اندام‌هاي مختلف (ناي، ريه، كليه، طحال، تيموس، بورس فابريسيوس، دوازدهه، پانكراس، كبد و مغز) در فرمالين بافر ۱۰ درصد پايدار گرديد. پس از پايدارسازي به روش متداول در آزمايشگاه‌هاي هيستوپاتولوژي، قالب‌گيري در پارافين به عمل آمد. سپس مقاطع ۵ ميكروني تهيه و با رنگ هماتوكسيلين-ائوزين رنگ‌آميزي و با استفاده از ميكروسكوپ نوري مورد مطالعه قرار گرفت.

ج- آزمايش ايمونوفلورسانس غير مستقيم

جهت بررسي حضور آنتي‌ژن ويروس آنفلوانزا در بافت‌هاي مختلف با استفاده از تكنيک ايمونوفلورسانس غيرمستقيم، نمونه‌هايي با ابعاد ۴ ميلي‌متر مكعب برداشته شد. نمونه‌هاي برداشته شده بلافاصله به فريزر ۷۰- درجه سانتي‌گراد منتقل گرديدند. قبل از شروع آزمايش، نمونه‌ها به فريزر داخل كرايوستات (Cryocut 1800, Leica, Reichert Jung) منتقل شدند. سپس هر كدام از بافت‌ها روي پايک‌هاي خاص قرار داده و برش‌هاي سرپالي از بافت‌ها تهيه شد و ۳ تا ۴ برش روي يک لام قرار داده شد. به مدت ۱۵-۱۰ دقيقه در حرارت آزمايشگاه برش‌ها را خشک نموده و با استفاده از استون تثبيت گرديد و پس از خشک شدن جهت رديابي آنتي‌ژن‌هاي ويروس، پادتن مونوكلنال اوليه بر عليه نوكلئوپروتئين ويروس آنفلوانزا تحت تيپ (H9N2)، (MAB8258, Chemicon, USA) با رقت ۱/۷۰ و به ميزان ۵۰ ميكروليتر روي مقاطع بافتي مورد آزمايش اضافه گرديد.

سپس لام‌ها در گرم‌خانه مرطوب ۳۷ درجه سانتي‌گراد به مدت ۴۵ دقيقه قرار داده شدند. بعد از اين مدت، لام‌ها در محلول PBS سه دفعه و هر بار به مدت ۵ دقيقه شستشو داده شدند. سپس لام‌ها را سريع خشک نموده و پادتن نشان دار ثانويه، (AP130F, Chemicon, USA) را با رقت ۱/۵۰ و به ميزان ۵۰ ميكروليتر اضافه نموده و در گرم‌خانه مرطوب ۳۷ درجه سانتي‌گراد به مدت ۳۰ دقيقه قرار داده شدند. بعد از اتمام انكوباسيون، لام‌ها را در محلول PBS سه دفعه و هر بار به مدت ۵ دقيقه شستشو و يک قطره بافر گليسرول روي نمونه بافتي ريخته و لامل روي آن قرار داده شد. لام‌ها در محفظه مرطوب و تاريک در ۴ درجه سانتي‌گراد جهت مشاهده با ميكروسكوپ فلورسانس (Ceti, Belgium) نگهداري شدند.

یافته‌ها

الف- یافته‌هاي باليني

در جوجه‌هاي گروه آزمايش، در روزهاي ۲ تا ۶ پس از تلقيح ويروس، نشانه‌هايي از قبيل افسردگي، ژوليدگي پر، ادم سر و صورت و التهاب ملتحمه ديده شد. در جوجه‌هاي گروه شاهد در هيچ‌يک از روزهاي آزمايش، نشانه‌هاي غير طبيعي مشاهده نگرديد.

ب- يافته‌هاي كالبدگشايي

جراحات غالب در جوجه‌هاي گروه آزمايش كه از روز ۴ تا ۶ پس از تلقيح قابل رؤيت بود، كدورت كيسه‌هاي هوايي سينه‌اي و شكمي، پرخوني ملايم ناي و ريه و تجمع اكسوداي فيبريني در مخاط ناي بود. در جوجه‌هاي گروه شاهد، هيچ‌گونه جراحت كالبد گشايي مشاهده نشد.

ج- يافته‌هاي سرولوژي

عيار آنتي‌بادي اختصاصي ويروس آنفلوانزاي H9N2 در جوجه‌هاي گروه آزمايش در روزهاي ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۱ به ترتيب ۳، ۲/۴، ۱/۷، ۳/۳، ۴/۲ و ۵/۶ و در جوجه‌هاي گروه شاهد به ترتيب ۳، ۲/۷، ۲/۳۴، ۱/۸، ۱/۲۴ و ۰ بود.

د- يافته‌هاي هيستوپاتولوژي و ايمونوفلورسانس

نتايج مربوط به جوجه‌هاي گروه آزمايش، در جداول شماره ۱ و ۲ آمده است.

جدول۱: نتايج هيستوپاتولوژي و ايمونوفلورسانس ارگان‌هاي جوجه‌هاي تلقيح شده (۱۸ پرنده) با ويروس آنفلوانزاي طيور تحت تيپ (H9N2) (EID_{50} ۱۰۶ به ازاي هر پرنده)

بافت	درصد ضايعات	جراحات غالب	حضور آنتي‌ژن ويروس در بافت
ناي	۷۲/۲	نكروز، تراكئيت	+
ريه	۵۵/۵	نكروز، پنوموني	+
كليه	۲۷/۷	نكروز، نفريت	+
طحال	۲۲/۲	هيپرپلازي لنفوئيد و سلول هاي رتيكولواندوتليال	-
تيموس	۲۲/۲	تخليه لنفاوي	-
بورس فابريسيوس	۱۶/۶	آتروفي لنفاوي	-
دوازدهه	۱۱/۱	هيپرپلازي لنفوئيد	-
پانكراس	۵/۵	نفوذ لنفوسيتي ،واكوئوله شدن سلول ها	-
كبد	۰	-	-
مغز	۰	-	-

طحال، بيشترين تغييرات بافتي را در بين اندام‌هاي لنفاوي داشت ولي نكروز و التهاب در اين اندام ديده نشد. در بخش قشري تيموس، تخليه لنفوسيتي و در بورس فابريسيوس، آتروفي لنفاوي و كيستيک شدن فوليكول‌هاي لنفاوي ملاحظه شد. در ناي، تراكئيت حاد همراه با ادم، پرخوني، از بين رفتن مژه‌ها، دژنراسيون غدد موكوسي و نفوذ هتروفيل‌ها در روز ۲ پس از تلقيح ويروس مشاهده گرديد. در روزهاي ۴، ۶، ۸ و۱۱ پس از تلقيح ويروس، تراكئيت لنفوسيتيک، از بين رفتن مژه‌ها و هيپرپلازي اپي‌تليوم ناي، يافته هيستوپاتولوژيک غالب بود، اما در روز ۱۱ تعداد جوجه‌هاي مبتلا و شدت جراحات، به طور قابل توجهي كاهش پيدا كرد (جدول۲).

جدول ۲: فراواني و شدت جراحت‌هاي ريزبيني اندام‌هاي مختلف به دنبال تلقيح داخل بيني ويروس آنفلوانزاي طيور تحت تيپ (H9N2) به جوجه‌ها

بافت	روز ۱	روز ۲	روز۴	روز۶	روز ۸	روز ۱۱
ناي	۱/۳*	۲/۳	۳/۳	۳/۳	۲/۳	۲/۳
	۱** (+)	۱ (+)	۱ (+)	۱ (++)	۲ (++)	۱ (+)
		۱ (++)	۲ (++)	۲ (+++)		۱ (++)
ريه	۰/۳	۱/۳	۲/۳	۳/۳	۲/۳	۲/۳
		۲ (+)	۱ (+)	۲ (++)	۲ (++)	۲ (+)
			۱ (++)	۱ (+++)		
كليه	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۱/۳	۲/۳	۲/۳
				۱ (+)	۱ (+)	۲ (++)
					۱ (++)	
طحال	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۱/۳	۱/۳	۲/۳
				۱ (+)	۱ (++)	۲ (++)
تيموس	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۱/۳	۱/۳	۲/۳
				۱ (++)	۱(++)	۲ (++)
بورس فابريسيوس	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۱/۳	۲/۳
					۱ (+)	۱ (+)
						۱ (++)
دوازدهه	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۲/۳	۰/۳	۰/۳
				۲ (+)		
پانكراس	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۱/۳	۰/۳
					۱ (++)	
كبد	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳
مغز	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳

* تعداد جوجه های دارای جراحت به کل جوجه های کالبدگشایی شده در گروه آزمایش

** شدت جراحات : ملایم (+)، متوسط (++)، شدید (+++)

نفوذ لنفوسيت‌ها در لايه پارين برونش‌هاي ثانويه به همراه پنوموني، تغييرات بافتي عمده در ريه، در روزهاي ۴ تا ۱۱ پس از تلقيح ويروس بود. نفوذ لنفوسيتي مختصر در پارانشيم پانكراس و واكوئوله شدن ملايم سلول‌هاي پانكراس و هيپرپلازي لنفوئيد در دوازدهه، از يافته‌هاي هيستوپاتولوژيک ديگر بود. يافته هيستوپاتولوژيک غالب در بافت كليه، نفريت لنفوسيتيک لوله‌اي-بينابيني به همراه نكروز و نفوذ لنفوسيت‌ها بود. در بافت كبد و مغز جوجه‌هاي تلقيح شده با ويروس آنفلوانزا، هيچ‌گونه جراحت بافتي ديده نشد.

با كاربرد تكنيک ايمونوفلورسانس غير مستقيم، حضور آنتي‌ژن (نوكلئوپروتئين) ويروس آنفلوانزا در بافت‌هاي ناي، ريه و كليه (جدول۱) به اثبات رسيد. كليه اندام‌هاي جوجه‌هاي گروه شاهد از لحاظ بافت‌شناسي سالم بوده و هيچ‌گونه جراحتي در آنها

دیده نشد و از نظر حضور آنتي‌ژن ويروسي در بافت‌ها نيز منفي بودند.

بحث

بيشترين جراحات هيستوپاتولوژيک مشاهده شده در جوجه‌هاي تلقيح شده با ويروس آنفلوانزاي (H9N2) جدا شده از ايران در اين تحقيق شامل تراکئيت، پنوموني و نفريت بينابيني بود. در اين مطالعه، نشانه‌هاي باليني و جراحات، تقريباً مشابه ولي بسيار ملايم‌تر از نشانه‌ها و جراحات ناشي از عفونت طبيعي آنفلوانزاي (H9N2) در طي همه‌گيري ايران و پاکستان بود (۱۱-۹ و ۱۷). تشکيل لخته‌هاي پنيري در محل دو شاخه شدن ناي که در همه‌گيري آنفلوانزاي (H9N2) در شرايط مزرعه گزارش شده (۱۰ و ۱۱)، در اين تحقيق مشاهده نگرديد.

شالابي (Shalaby) (۱۹۹۴) علت بالاتر بودن ميزان مرگ و مير جوجه، بوقلمون و ساير ماکيان در طي همه‌گيري‌هاي طبيعي در مزرعه نسبت به مطالعات تجربي را، تأثير عوامل محيطي و يا ساير عوامل استرس‌زا مي‌داند (۱۸). عفونت‌هاي همزمان از جمله برونشيت عفوني و مايکوپلاسموز با آنفلوانزا در شرايط مزرعه رخ مي‌دهد که ممکن است در ايجاد قالب‌هاي پنيري مسدودکننده مجاري برنش‌ها نقش داشته باشد (۱۰ و ۱۱). مطالعات اخير نشان مي‌دهند که استفاده از واکسن زنده برونشيت عفوني در مواقعي که عفونت ناشي از ويروس آنفلوانزاي H9N2 در گله وجود دارد نه تنها شدت نشانه‌هاي باليني و جراحات را افزايش مي‌دهد بلکه باعث افزايش ميزان مرگ و مير و طولاني شدن دوره دفع ويروس آنفلوانزا مي‌گردد (۱۹ و ۲۰). با توجه به موارد فوق، توصيه مي‌شود در موقع عفونت با ويروس آنفلوانزاي با بيماري‌زايي کم (H9N2) تا حد ممکن نسبت به حذف عوامل تشديدکننده بيماري‌زايي، اقدامات مناسب صورت گيرد. همه‌گيري‌هاي ناشي از ويروس‌هاي آنفلوانزاي کم بيماري‌زا در جوجه‌هاي تخم‌گذار، با مرگ و مير و ضايعات دستگاه ادراري-تناسلي همراه بوده است (۱۸).

حبل الوريد (Hablolvarid) و همکاران (۲۰۰۴ و ۲۰۰۳)، با تزريق داخل وريدي و داخل نايي جدايه‌اي از ويروس آنفلوانزا تحت تيپ H9N2 به ماکيان ۵ هفته‌اي، در روش تزريق داخل وريدي، نفريت لوله‌اي-بينابيني و پانکراتيت و حضور آنتي‌ژن ويروسي را در بافت‌هاي کليه و پانکراس و در روش تلقيح داخل نايي، تراکئيت، پنوموني، نفريت و حضور آنتي-ژن ويروس را در بافت‌هاي ناي و ريه مشاهده کردند (۲۱ و ۲۲).

بانو (Bano) و همکاران (۲۰۰۳) با تلقيح جدايه‌اي از ويروس آنفلوانزا تحت تيپ H9N2 با روش‌هاي مختلف به ماکيان و سپس مواجه کردن آنها با ساير عوامل عفوني، حضور آنتي‌ژن ويروس را در بافت‌هاي ناي، ريه، کليه و بورس فابريسيوس نشان دادند (۱۷).

مو (Mo) و همکاران (۱۹۹۷) با تلقيح داخل نايي جدايه‌هاي ويروس آنفلوانزا با بيماري‌زايي کم و زياد به ماکيان، جراحات ناشي از ويروس‌هاي با بيماري‌زايي کم و آنتي‌ژن آنها را در بافت‌هاي ناي و ريه گزارش کردند (۲۳).

در مطالعه‌اي ديگر (۱۹۹۵) به دنبال تزريق داخل وريدي ويروس‌هاي بدون حدت H4N4، H6N2 و H3N8 به ماکيان، جراحات ناشي از اين ويروس‌ها و حضور آنتي‌ژن آن‌ها، فقط در بافت کليه به اثبات رسيد (۲۴).

بك (Beck) و سووين (Swayne) (۲۰۰۵) به دنبال تلقيح داخل بيني ويروس‌هاي آنفلوانزا با بيماري‌زايي

کم و بيماري‌زايي زياد، نشان دادند که ويروس‌هاي با بيماري‌زايي کم، تنها قادر به ايجاد جراحات موضعي در دستگاه تنفس و گوارش هستند (۲۵).

سلمونز (Slemons) و سووين (Swayne) (۱۹۹۴) با تزريق سه سويه ويروس آنفلوانزاي کم بيماري‌زا (يکي با منشاء جوجه و دو تا با منشاء اردک) به روش داخل وريدي، داخل نايي و داخل بيني به جوجه‌هاي پنج هفته‌اي، مشاهده کردند که در گروه داخل نايي و به ميزان کمتري در گروه داخل بيني، تراکئيت خفيف تا شديد، برونشيت و پنوموني در اطراف برونش‌هاي ثانويه وجود دارد، ولي نفريت و نکروز لوله‌هاي ادراري وجود نداشت (۲۶). در حالي‌که در مطالعات ديگري، تلقيح جوجه‌ها به روش داخل بيني و داخل نايي با ويروس‌هاي آنفلوانزاي کم بيماري‌زا با منشاء اردک و ماکيان، منجر به جراحات کليه وتلفات در جوجه‌هاي ۱ روزه و ماکيان بالغ شده است. نکروز شديد لوله‌هاي ادراري و متعاقباً نارسايي کليه مي‌تواند به عنوان عامل مرگ مطرح باشد (۳۱-۲۷).

در مطالعه حاضر، وجود نکروز و التهاب، همراه با حضور نوکلئوپروتئين ويروس آنفلوانزاي (H9N2) در بافت‌هاي نايي، ريه و کليه، نشان‌دهنده تروپيسم بافتي ويروس و آسيب ناشي از تکثير ويروس در اين اندام‌ها است.

در اين تحقيق در روز دوم پس از تلقيح داخل بيني ويروس آنفلوانزا (H9N2)، علائم تراکئيت حاد (هتروفيليک) ايجاد شد و در روزهاي بعد به شکل تراکئيت لنفوسيتي ادامه يافت. ضايعات در ريه، عمدتاً به شکل ارتشاح لنفوسيت‌ها در لايه پارين برونش‌هاي ثانويه و کانون‌هاي پنوموني در پيرامون آن‌ها بود. ضايعات اين دو عضو تا روز هشتم پس از تلقيح، بسيار چشم‌گير بود ولي در روز يازدهم از شدت ضايعات کاسته شد که از لحاظ باليني هم، با بهبود در وضعيت کلينيکي جوجه‌ها همراه بود. مشاهده آنتي‌ژن ويروس در ناي و ريه (روزهاي ۲، ۴، ۶ و ۸ پس از تلقيح ويروس)، حاکي از تکثير ويروس در اين دو عضو بود. در مطالعه حاضر، نفريت لوله‌اي-بينابيني از روز ششم پس از تلقيح ويروس مشاهده گرديد. وجود کانون‌هاي نفريت و حضور آنتي‌ژن ويروس در بافت کليه (روز ۸) احتمالاً ناشي از عفونت دستگاه تنفس (کيسه‌هاي هوايي) در اثر مجاورت کيسه‌هاي هوايي شکمي با کليه‌ها است.

شالابي (Shalaby) (۱۹۹۴) جدا شدن ويروس از کليه، مگنوم و تخم‌دان مرغ‌هايي که به روش داخل نايي تلقيح گرديده بودند را ناشي از عفونت دستگاه تنفس مي‌داند (۱۸). در مجموع بايد به احتمال بروز ضايعات کليوي در مواقع ابتلاء طبيعي به ويروس (H9N2) از طريق دستگاه تنفس و با واسطه کيسه‌هاي هوايي توجه داشت.

سلمونز (Slemons) و سووين (Swayne) (۱۹۹۲) گزارش کردند که جراحات بافت کليه در جوجه‌هاي تلقيح شده با ويروس‌هاي آنفلوانزاي کم بيماري‌زا، بسيار شديد مي‌باشد و کليه جوجه به عنوان جايگاه بالقوه جهت بقاء ويروس مي‌باشد (۳۲). همين محققين، مدعي هستند که بين دفعات جداسازي ويروس از بافت کليه و سوآب کلواکي و همچنين تيتر ويروس در بافت کليه، در مقايسه با ديگر بافت‌ها اختلاف معني‌داري وجود دارد (۳۳ و ۳۴).

با توجه به ضايعات کليوي (نکروز و نفريت) و نيز مشاهده نوکلئوپروتئين‌هاي ويروسي در بافت کليه، مي‌توان نتيجه گرفت که کليه محل مناسبي براي تکثير ويروس آنفلوانزاي (H9N2) است.

مشاهده پادگن‌هاي ويروس آنفلوانزا در بافت کليه،

علي‌رغم اينكه سويه ويروس آنفلوانزاي شناخته شده در ايران جزء ويروس‌هاي آنفلوانزا با حدت كم بوده، بسيار جالب توجه است و ممكن است تلفات ناشي از ويروس‌هاي آنفلوانزاي طيور ايران، به علت بقاء ويروس در بافت كليه باشد، به همين جهت توصيه مي‌شود تحقيقات تكميلي جهت اثبات اين فرضيه انجام گيرد.

تغييراتي كه در طحال، دوازدهه و پانكراس جوجه‌هاي تلقيح شده به روش داخل بيني ملاحظه گرديد، عمدتاً به شكل هيپرپلازي سلول‌هاي رتيكولواندوتليال و سلول‌هاي فاگوسيتيک تک هسته‌اي بود كه مي‌تواند به علت پاسخ ايمني لنفوسيت‌هاي B و T به آنتي‌ژن‌هاي خارجي باشد (۳۳). آتروفي بورس و تيموس، شباهت بسيار به پاسخ‌هاي غير اختصاصي نسبت به گلوكوكورتيكوئيدهاي آندوژن دارد. فقدان نكروز لنفوسيت‌ها در ارگان‌هاي لنفاوي اوليه و يا ثانويه و عدم حضور آنتي‌ژن ويروسي در اين اندام‌ها، نشان‌دهنده اين مطلب است كه بافت‌هاي لنفاوي، ارگان هدف براي اين سويه نمي‌باشند (۳۳).

اخيراً تحقيقي كه در ارتباط با تروپيسم ويروس‌هاي آنفلوانزاي (H9N2) و تكثير آنها در دستگاه تنفس انسان انجام گرفته نشان‌دهنده تغيير تروپيسم اين ويروس‌ها است بطوري‌كه با جايگزيني اسيدآمينه گلوتامين با لوسين در موقعيت ۲۲۶ جايگاه اتصال گيرنده ژن هماگلوتينين، اين ويروس‌ها ترجيحاً سلول‌هاي بدون مژه دستگاه تنفس را هدف قرار مي‌دهند كه از اين نظر مشابه ويروس‌هاي آنفلوانزاي انساني و متفاوت با ويروس‌هاي پرندگان آبزي (كه ترجيحاً سلول‌هاي مژه‌دار دستگاه تنفس را مبتلا مي‌كنند) مي‌باشند (۳۵).

وجود ضايعات تراكئيت، پنوموني و نفريت بينابيني در بافت‌هاي ناي، ريه و كليه و مشاهده آنتي‌ژن ويروسي در اين بافت‌ها، بيانگر طبيعت اپي‌تليوتروپ اين ويروس (H9N2) است. بطوركلي، با توجه به نتايج به دست آمده در اين تحقيق، مي‌توان ادعا نمود كه ويروس آنفلوانزا تحت تيپ (H9N2) ويروسي كم بيماري‌زا و در عين حال پنوموتروپ و نفروتروپ است.

تشکر و قدردانی:

بدينوسيله از زحمات پرسنل محترم مركز تحقيقات طيور دانشكده دامپزشكی دانشگاه شيراز، بخش ايمونولوژی دانشكده پزشكی دانشگاه علوم پزشكی شيراز و آزمايشگاه بافت شناسی بيمارستان شهيد دكتر چمران شيراز صميمانه تشكر و قدردانی می نماييم.

References:

1. Alexander DJ. Orthomyxovirus infections. In: McFerran JB, McNulty MS, Horzinek MC, editors. (1994). Viral infections of vertebrates. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1994, 287-316.
2. Fouchier Ron AM, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (h16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005; 79: 2814-22.
3. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, et al. Diseases of Poultry. 11th ed. Iowa: Ames, 2003, 135-60.
4. Swayne DE. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. Avian Dis 2007; 50: 242-9.
5. Swayne DE, Halvorson DA. Influenza. In: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, et al, editors. Diseases of Poultry, 11th ed. Iowa: Ames, 2003, 135-60.
6. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. Rev Sci Tech 2000; 19: 463-82.
7. Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB. Deduced amino acid sequences at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. Arch Virol 1993; 130: 209-17.
8. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol 2000; 74: 3-13.
9. Naeem K, Ulah A, Manvell RJ, et al. Avian influenza subtype H9N2 in poultry in Pakistan.

Vet Rec 1999; 145: 560.
10. Nili H, Asasi K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathol 2002; 31: 247-52.
11. Nili H, Asasi K. Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. Avian Dis 2003; 47: 828-31.
12. Nili H, Asasi K, Dadras H, et al. Pathobiology of H9N2 avian influenza virus in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Avian Dis 2007; 50: 390-2.
13. Pourbakhsh SA, Khodashenas M, Kianizadeh M, et al. Isolation and identification of influenza virus H9N2 subtype. Arch Razi Inst (Arch Hessarek Iran) 2000; 51: 27-38.
14. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, et al. Heterogeneity in the hemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. J Gen Virol 1996; 77: 1493-504.
15. Perdue ML, Garcia M, Senne D, et al. Virulence associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. Virus Res 1997; 49: 173-86.
16. Vasfi Marandi M, Bozorgmehrifard MH. Isolation of H9N2 subtype of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. Iranian Biomed J 2002; 6: 613-7.
17. Bano S, Naeem K, Malik SA. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. Avian Dis 2003; 47: 817-22.
18. Shalaby AS, Slemons RD, Swayne DE. Pathological studies of A/Chicken/Alabama/ 7395/75 (H4N8) influenza A virus in specific pathogen-free laying hens. Avian Pathol 1994; 24: 623-32.
19. Haghighat-Jahromi M, Asasi K, Nili H, et al. Role of infectious bronchitis live vaccine on pathogenicity of H9N2 avian influenza virus. Int J Poult Sci 2007; 6: 838-41.
20. Haghighat-Jahromi M, Asasi K, Nili H, et al. Coinfection of avian influenza virus (H9N2 subtype) with infectious bronchitis live vaccine. Arch Virol 2008; 153: 651-5.
21. Hablolvarid MH, Sohraby Haghdost I, Pourbakhsh SA, et al. A study on histopathologic changes in chicken following intravenous inoculation with avian influenza virus A/Chicken/ Iran/259/ 1998(H9N2). Arch Razi Inst (Arch Hessarek Iran) 2003; 55: 41-54.
22. Hablolvarid MH, Sohraby Haghdost I, Pourbakhsh SA, et al. Histopathological study of intratracheally inoculated A/Chicken/Iran/259/1998(H9N2) influenza virus in Chicken. Arch Razi Inst 2004; 58: 51-62.
23. Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, et al. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. Avian Dis 1997; 41: 125-36.
24. Hooper PT, Russell GW, Selleck PW, et al. Observations on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs. Avian Dis 1995; 39: 458-64.
25. Swayne DE, Beck JR. Experimental study to determine if low-pathogenicity and high-pathogenicity avian influenza viruses can be present in chicken breast and thigh meat following intranasal virus inoculation. Avian Dis 2005; 49: 81-5.
26. Swayne DE, Slemons RD. Comparative pathology of a chicken origin and two duck origin influenza virus isolated in chicken, the effects of route of inoculation. Vet Pathol 1994; 31: 237-45.
27. Slemons RD, Swayne DE. Replication of a water fowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chicken. Avian Dis 1990; 34: 227-34.
28. Slemons RD, Locke LN, Sheerer MG, et al. Kidney lesions associated with mortality in chickens inoculated with water fowl influenza viruses. Avian Dis 1990; 34: 120-8.
29. Slemons RD, Swayne DE. Tissue tropism and replicative properties of waterfowl-origin influenza viruses in chickens. Avian Dis 1995; 39: 521-7.
30. Swayne DE, Radin MJ, Slemons RD. Acute renal failure as the cause of death in chickens following intravenous inoculation with avian influenza virus A/Chicken/Alabama/7395 /75(H4N8). Avian Dis 1994; 38: 151-7.
31. Swayne DE, Pantin-Jackwood M. Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry. Dev Biol 2006; 124: 61-7.
32. Swayne DE, Slemons RD. Evaluation of the kidney as a potential site of avian influenza virus persistence in chickens. Avian Dis 1992; 36: 937-44.
33. Swayne DE, Slemons RD. Comparative pathology of intravenously inoculated wild duck and turkey origin type A influenza virus in chickens. Avian Dis 1995; 39: 74-84.
34. Swayne DE, Slemons RD. Renal pathology in specific pathogen free chickens inoculated with a waterfowl-origin type A influenza virus. Avian Dis 1990; 34: 285-94.
35. Wan H, and Perez DR. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. J Virol 2007; 81: 5181-91.