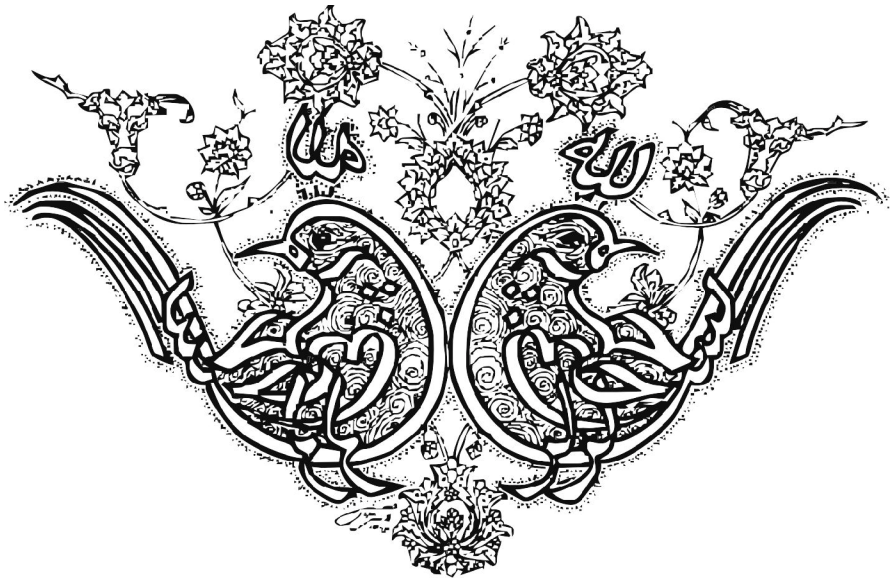

دانشکده دامپزشکی

گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه برای دریافت درجه دکتری حرفه ای در رشته دامپزشکی

عنوان

مطالعه ایمونوهیستوپاتولوژیک بیماریزایی جدایه های تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای تیپ A پرندگان در جوجه های گوشتی

استادان راهنما

دکتر جواد اشرفی هلان

دکتر وحید کریمی

استاد مشاور

دکترحسین حسینی

پژوهشگر

زهرا رضائی

آبان ۱۳۹۰

تقدیم به :

جامعه علمی کشور عزیزم ایران

و تمام کسانی که در این راه همراهم بوده و خواهند بود...

با تشکر از:

پدر و مادر عزیزم که همواره در کنارم بودند

برادران، خواهران و همسرم

با تشکر از اساتید گرانقدرم: دکتر طایفی، دکتر دیهیم، دکتر کریمی، دکتر وفایی سیاح، دکتر رجبی، دکتر کلاهیان، دکتر طلوعی، دکتر رضازاده، دکتر اسدپور، دکتر نفوذی، دکتر شیخ زاده، دکترزارع، دکتر نعمت اللهی، دکتر سیوفی، دکتر جارالمسجد، دکتر موسوی، دکتر جعفری جوزانی، دکتر حملی، دکتر عباسی و سایر اساتید محترمی که از دانشکده های دیگر قبول زحمت نمودند

اساتید محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

با تشکر از کلیه کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز: آقای مهندس ابراهیمیان، آقای مهندس حقی، آقای مهندس مفتونی، اقای مهندس بیگ محمدی، خانم قانعی فر، خانم مهندس جعفری، آقای رضاوندی، آقای فتوحی، خانم رضوی

تشکر فراوان از استاد محترم و گرانقدرم جناب آقای دکتر جواد اشرفی

هلان از قبول زحمت ایشان به عنوان استاد راهنمای بنده، زحمات

فراوان، راهنمایی های گرانقدر و تلاش های بی دریغ شان در طی این

سالها که همواره امید بخش بوده و خواهد بود...

با تشکر از دوست و همکلاسی گرامی ام جناب آقای دکتر محسن آسمند، از همکاری و

راهنمایی های ارزشمندشان

تشکر از استاد محترم سرکار خانم دکتر کتایون نفوذی که زحمت داوری این پایان نامه را تقبل

فرمودند.

تشکر ویژه از جناب آقای دکتر وحید کریمی استاد محترم بخش طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران از قبول زحمت ایشان به عنوان استاد راهنمای بنده و امکان برخورداری از امکانات پرورشی و آزمایشگاهی بیمارستان آموزشی و پژوهشی تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (محمد شهر کرج)

تشکر فراوان از جناب آقای دکتر برین و آزمایشگاه دامپزشکی ایران

تشکر فراوان از جناب آقای دکتر حسینی استاد مشاور بنده

تشکر ویژه از جناب آقای مهندس سلیمانی کارشناس محترم بخش طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران از قبول زحمت ایشان در انجام مراحل عملی پایان نامه و راهنمایی های ایشان

تشکر از جناب آقای مهندس صادقی کارشناس محترم بخش طیور بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران

تشکر از جناب آقای مهندس ستاری کارشناس محترم آزمایشگاه بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران

و تشکر از کلیه پرسنل محترم بیمارستان تخصصی آموزشی-پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

این پایان نامه علاوه بر هزینه اختصاص داده شده از سوی تحصیلات تکمیلی دانشگاه تبریز، با استفاده از اعتبار ویژه پژوهشی جناب آقای دکتر جواد اشرفی هلان (بعنوان استاد راهنما) صورت پذیرفته است و بدین ترتیب مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اعلام می نمایم.

نام خانوادگی دانشجو: رضائی **نام:** زهرا

عنوان پایان نامه: مطالعه ایمونوهیستوپاتولوژیک بیماریزایی جدایه های تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای تیپ A پرندگان در جوجه های گوشتی

استادان راهنما: دکتر جواد اشرفی هلان و دکتر وحید کریمی

استاد مشاور: دکتر حسین حسینی

مقطع تحصیلی: دکتری **رشته:** دامپزشکی **گرایش:** پاتوبیولوژی **دانشگاه:** تبریز **دانشکده:** دامپزشکی **تاریخ فارغ التحصیلی:** ۱۳۹۰/۸/۱۷ **تعداد صفحه:** ۱۲۰

کلید واژه ها: جوجه گوشتی، ویروس آنفلوآنزای پرندگان، تحت تیپ H9N2، جدایه ها، هماتولوژی، سرولوژی، الایزا، RSA، HI، PCR ، کالبد گشایی، هیستوپاتولوژی، ایمونوژن

چکیده: واگیری های بیماری آنفلوانزای پرندگان ناشی از تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای پرندگان در صنعت طیور ایران از سال ۱۹۹۸ رخ داده است و سبب خسارات اقتصادی جدی شده است. هدف این پایان نامه، مطالعه علائم بالینی، سیر بیماریزایی، کالبدگشایی، تغییرات ماکروسکوپیک و هیستوپاتولوژیک، هماتولوژیک و سرولوژیک جوجه هایی است که به طور تجربی با دو سویه ویروس آنفلوانزا A/Chicken/Iran/TH85/2006(H9N2) و A/Chicken/Iran/TH286/2007(H9N2) مورد چالش قرار گرفته اند. این جدایه ها از بانک ویروس دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده اند. همچنین در این مطالعه، اثر یک ماده ایمونوژن در جوجه های چالش شده با این دو سویه ویروس مورد بررسی قرار گرفته اند. در این پژوهش، تعداد ۱۰۰ قطعه جوجه گوشتی یکروزه، در طی یک دوره پرورشی ٤٠ روزه، مورد آزمایش قرار گرفته و جوجه ها به ٦ گروه که شامل چهار گروه درگیر که هر ۲ گروه یک جدایه از ویروس H9N2 و ۲ گروه ویروس به همراه ایمونوژن دریافت نمودند، یک گروه کنترل مثبت که ایمونوژن به تنهایی و یک گروه کنترل منفی که هیچ نوع دارو یا ویروسی را دریافت نکردند، تقسیم شدند. طی دو مرحله و به فاصله ۱۰ روز یک دوز از ماده ایمونوژن (روز هیجدهم و بیست و هشتم) به یک گروه از جوجه های درگیر دریافت کننده هر یک از سویه های ویروس و گروه کنترل مثبت تزریق شد. در روز سی ام، ویروس ها با ELD50 10^{6} تا $10^{8/5}$، به طریق

داخل وریدی، به جوجه های گروه درگیر تلقیح، به مدت ۱۰ روز، روزانه از جهت بروز علائم بالینی و تلفات مورد مشاهده قرار گرفتند. در پایان روز چهلم تمامی جوجه ها کشتار و وزن لاشه ها به همراه وزن اندام های داخلی(کبد، قلب، ریه، طحال، تیموس و بورس فابروسیوس) اندازه گیری و پس از مشاهده و ضبط تغییرات ماکروسکوپیک اندامها (کالبدگشایی)، مورد مطالعه آسیب شناختی قرارگرفتند. قبل از تلقیح ویروس و در پایان دوره آزمایش، خونگیری به منظور انجام آزمایش های هماتولوژی از جمله شمارش کلی و تفریقی گلبول های خونی و اندازه گیری فاکتورهای خونی مانند پروتئین تام و فیبرینوژن انجام شد. بخشی از سرم خون جهت انجام آزمایش الایزا جهت پی بردن به آلودگی به اورنیتوباکتریوم رینوتراکئاله و برونشیت عفونی، اندازه گیری تیتر آنتی بادی (HI) علیه آنفلوانزا و نیوکاسل و آزمایش آگلوتیناسیون سریع سرم (Rapid serum agglutination) برای یافتن آلودگی به مایکوپلاسما گالیسپتیکوم و مایکوپلاسما ساینوویه مورد استفاده قرار گرفت. همچنین اخذ سوآب نایی به منظور انجام آزمایش PCR انجام شد. ضایعات اصلی کالبدگشایی در جوجه ها، شامل پرخونی شدید ریه، پرخونی شدید به همراه التهاب کلیه و پرخونی، بزرگ شدن و خونریزی تیموس بود. پرخونی در لاشه ها مشاهده شد. یافته های سرولوژیکی نشان دهنده درگیری جوجه ها با AI در تمامی گروهها بود. جوجه ها نشانه ای از عفونت با Mg، Ms، ویروس نیوکاسل و برونشیت درگیری نشان نمی دادند. یافته های هیستوپاتولوژیک نشان دهنده پرخونی شدید به همراه لنفوسیتولیز خفیف در طحال، تیموس و بورس فابیروسیوس بود. نای دارای تراکئیت نکروزان و اروزیون در سطح مخاط آن بود. قلب دارای پریکاردیت، میوکاردیت و اندوکاردیت کانونی بود. التهاب پیش معده، پرده های منتز و پانکراس محرز بود. تابلوی خونی نشانگر کم خونی، هتروفیلی و لنفوپنی بود. تغییرات آسیب شناختی خاصی در گروههای دریافت کننده ایمونوژن (کنترل مثبت) دیده نشد. شدت ضایعات در گروههای دریافت کننده ایمونوژن کمتر از گروههای درگیر بود. نتایج بدست آمده نشان داد ماده ایمونوژن مورد استفاده، می تواند از شدت بیماری کاسته و در درمان و حتی پیشگیری از بیماری آنفلوآنزا مؤثر باشد. همچنین مشاهده ضایعات در بافت هایی غیر از نای و ریه (سیستم تنفسی) نشان دهنده آن است که جدایه های مورد مطالعه از تحت تیپ H9N2 ، تمایل به تکثیر در سایر بافت ها داشته و درآینده به عنوان یک تهدید بهداشتی برای سلامتی افراد انسانی در معرض خطر باشد.

چکیده ۱۰
فصل اول: مقدمه و کلیات ۱۷
۱-۱-مقدمه ۱۸
۱-۲-معرفی ویروس آنفلوآنزا ۲۱
۱-۳-سابقه ی بیماری آنفلوانزا پرندگان در جهان ۲۳
۱-٤-سابقه بیماری ناشی از ویروس H9N2 در دنیا ۲۸
۱-٥-سابقه بیماری ناشی از ویروس آنفلوانزایH9N2 در ایران ۳۰
فصل دوم: بیماری شناسی و علائم بالینی بیماری آنفلوانزای طیور ۳۳
۲-۱-علائم بالینی بیماری آنفلوانزای طیور ۳٤
۲-۱-۱-LPAI: ۳٤
۲-۱-۲-HPAI: ۳٥
۲-۲-علائم و جراحات کالبد گشایی آنفلوانزای پرندگان ۳٦
۲-۲-۱-LPAI: ۳٦
۲-۲-۲-HPAI: ۳۷
۲-۳-علائم هیستوپاتولوژی آنفلوآنزای طیور ۳۸
۲-۳-۱-LPAI: ۳۸
۲-۳-۲-HPAI: ۳۹
فصل سوم: مواد و روش کار ٤۱
۳-۱-تهیه و تکثیر ویروس: ٤۲
۳-۲-تزریق ماده ایمونوژن: ٤۲
۳-۳-جوجه های مورد آزمایش: ٤۳

٤-٣-تلقیح ویروس: ٤٤
٥-٣-توزین جوجه ها در روز ٣٠ و ٤٠: ٤٤
٦-٣-خونگیری و آزمایش های سرولوژیک ٤٥
١-٦-٣-آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون(HI) ٤٦
٢-٦-٣-آزمایش آگلوتیناسیون سریع سرم (Rapid serum aglutination) (RSA): ٤٧
٣-٦-٣-الایزا ٤٧
٧-٣- آزمایش های هماتولوژی: ٤٩
١-٧-٣-شمارش گلبول های قرمز: ٤٩
٢-٧-٣- هماتوکریت (حجم متراکم گلبولی یا PCV) ٤٩
٣-٧-٣-اندیس های گلبولی (مقادیر میانگین گلبولی) ٥٠
٨-٣-کشت ٥٠
٩-٣-نمونه برداری جهت PCR: ٥١
١-٩-٣-روش استخراج RNA از نمونه بافت ٥١
٢-٩-٣-آزمایش نسخه برداری معکوس (RT) ٥١
١٠-٣-پاتولوژی: ٥٢
١-١٠-٣-کالبد گشایی ٥٢
٢-١٠-٣-نمونه برداری جهت هیستوپاتولوژی: ٥٢
فصل چهارم: نتایج ٥٤
١-٤-نتایج مشاهدات بالینی : ٥٥
١-١-٤-محاسبه ضریب بیماریزایی داخل وریدی (IVPI): ٥٥
٢-٤-نتایج مشاهدات کالبدگشایی: ٥٥

۴-۳-نتایج آزمایش های سرولوژیک: ۶۰
۴-۳-۱-نتایج الایزا: ۶۰
۴-۳-۲-نتایج Rapid serum aglutination (RSA) ۶۳
۴-۳-۳-نتایج HI: ۶۳
۴-۴-نتایج PCR: ۶۵
۴-۵-نتایج کشت: ۶۵
۴-۶-نتایج هماتولوژی: ۶۵
۴-۶-۱-تغییرات تابلوی خونی در گروههای تیمار ۶۵
۴-۶-۲-اثر ماده ایمونوژن بر تابلوی خونی: ۷۱
۴-۷-نتایج هیستوپاتولوژی: ۷۵
۴-۸-نتایج وزن لاشه ها در روز های ۳۰ و ۴۰ آزمایش ۸۲
۴-۹-نتایج وزن اندام ها در روز های ۳۰ و ۴۰ آزمایش ۸۳
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۸۶
منابع: ۱۰۱
خلاصه انگلیسی: ۱۰۹
عنوان انگلیسی: ۱۱۲

فهرست جداول و تصاویر

تصویر ۱-۱: ویروس آنفلوانزا A خالص شده A/WSN/33 رنگ آمیزی منفی با اسید فسفوتنگستیک ۲٪. (Saif، ۲۰۰۸)

تصویر ۱-۳: تزریق ماده ایمونوژن به زیر جلد ناحیه گردن، در یک جوجه ۲۸ روزه

تصویر ۲-۳-نمایی از توزین جوجه ها بوسیله ترازو

تصویر شماره ٤-۱: تورم و پرخونی شدید در بافت کلیه(گروه سوم، گروه چالش با ویروس ۵۵)

تصویر ۲-٤: تورم و پرخونی شدید در بافت کلیه (گروه پنجم، گروه چالش با ویروس ٥٦)

تصویر ۳-٤: خونریزی در تیموس (گروه سوم، گروه چالش با ویروس ۵۵)

تصویر شماره ٤-٤: گروه پنجم (گروه چالش با ویروس ٥٦)

تصویر ۵-٤: پرخونی و تورم شدید همراه با درجاتی از رسوب اورات در کلیه در گروه پنجم (چالش با ویروس ٥٦)

تصویر٦-٤: گروه پنجم(گروه چالش با ویروس ٥٦)

تصویر شماره ۷-٤: نتایج مربوط به آزمایش ELISA جهت جستجوی آلودگی به برونشیت عفونی

تصویر ۸-٤: نتایج مربوط به آزمایش ELISA جهت جستجوی آلودگی به اورنیتوباکتریوم رینوتراکئاله

تصویر ۹-٤: نفریت بینابینی در کلیه پرنده مبتلا به آنفلوآنزای حاد پرندگان ناشی (H&E، درشتنمای× ۱۰۰)

تصویر ۱۰-٤: پرخونی شدید، تجمع هتروفیل ها و گسترش بخش مرکزی لوبول (اجسام مشبک) پرنده مبتلا به آنفلوآنزای حاد پرندگان ناشی از جدایه هایی از تحت تیپ H9N2 (H&E، درشتنمای× ۱۰۰).

×

تصویر ۱۱-٤: پرخونی، التهاب همراه با تجمع سلول های التهابی از نوع هتروفیل در بخش آندوکرین (insulitis) و اگزوکرین در پانکراس در پرنده مبتلا به آنفلوآنزای حاد پرندگان ناشی از جدایه هایی از تحت تیپ H9N2 (H&E، درشتنمای× ٤۰۰).

تصویر ۱۲-٤: پرخونی، التهاب همراه با خونریزی شدید در پارین و زیر مخاط نای در پرنده مبتلا به آنفلوآنزای حاد پرندگان ناشی از جدایه هایی از تحت تیپ H9N2 (H&E، درشتنمای× ۱۰۰).

تصویر ۱۳-٤: پرخونی، التهاب شدید با نفوذ سلول های التهابی در پارین، بین غدد و زیر مخاط پیش معده در پرنده مبتلا به آنفلوآنزای حاد پرندگان ناشی از جدایه هایی از تحت تیپ H9N2 (H&E، درشتنمای× ۱۰۰).

تصویر ١٤-٤- پرخونی، التهاب شدید با نفوذ سلول های التهابی در بین سلول های عضلانی قلب در پرنده مبتلا به آنفلوآنزای حاد پرندگان ناشی از جدایه هایی از تحت تیپ H9N2 (H&E، درشتنمای× ۱۰۰).

جدول ۱—۱: بیست و شش اپیدمی ثبت شده از HP AI (از کشف ویروس AI به عنوان علت طاعون پرندگان در ۱۹۵۵، تا سال ۲۰۰۷)

جدول ۱-٤: نتایج تست ممانعت از هماگلوتیناسیون برای بیماری های آنفلوانزا و نیوکاسل

جدول ۲-٤: مقایسه آماری مقادیر فاکتورهای خونی

جدول ۳-٤: مقادیر طبیعی اندیس های خونی

جدول ٤-٤: میانگین اندیس های خونی در گروههای مختلف

جدول ٥-٤: نتایج وزن لاشه ها در روزهای ۳۰ و ٤۰ آزمایش

جدول ٦-٤: نتایج وزن اندام ها در روزهای ۳۰ و ٤۰ آزمایش

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱-مقدمه

ویروس آنفلوانزا متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده و جنس آنفلوانزا ویروس است. این ویروس ها بر اساس نوکلئوپروتئین های داخلی و پروتئین آنتی ژنی ماتریکس به سه نوع A، B و C طبقه بندی می شوند. هر دو نوع آنتی ژن برای تمامی سویه های یک نوع ویروس آنفلوانزا یکی است. ویروس های آنفلوانزا بر طبق هماگلوتینین (H) و نورآمینیداز (N) گلیکوپروتئینی روی سطح شان به تحت تیپ هایی طبقه بندی می شوند (Swayne و Halverson ، ۲۰۰۳). ویروس های آنفلوانزای پرندگان (AIVs) متعلق به تیپ A بوده و ۱۶ تحت تیپ هماگلوتینی (H1-H16) و ۹ تحت تیپ نورآمینیدازی (N1-N9) برای آنها گزارش شده است (Foucheir و همکاران، ۲۰۰۵). بر اساس حدت (پاتوژنیسیته) AIVs برای حیوانات اهلی، این ویروس ها به ۲ گروه پاتوتیپی، ویروس های آنفلوانزای پرندگان با پاتوژنیسیته بالا (HPAI) که سبب مرگ و میر سریع در پرندگان می شود که اغلب تلفات به ۱۰۰٪ رسیده و ویروس های آنفلوانزای پرندگان غیر پاتوژن (nHPAI) که شامل ویروس های دارای (حدت) پاتوژنیسیته خفیف (MP)، ویروس های با پاتوژنیسیته پایین (LP) و ویروس های غیر پاتوژن (NP) AIVs که سبب بیماری های نامشخص با علائم تنفسی خفیف، کاهش تولید تخم مرغ می شود که گاهی اندکی افزایش میزان مرگ و میر همراه است (Capua و Alexander، ۲۰۰۶). با این وجود، در هنگام عفونت همزمان با ارگانیسم های باکتریایی و ویروسی دیگر و شرایط محیطی نامساعد،

بیماری شدید به همراه مرگ و میر بالا ناشی از ویروس با حدت پایین دیده شود، اگرچه که ویروس جدا شده در این موارد در جوجه ها در شرایط تجربی بیماری خفیف ایجاد کرده یا بیماری ایجاد نمی کنند (Banks و همکاران؛ Bano و همکاران، ۲۰۰۳؛ Swayne و همکاران، ۱۹۹۸). امروزه تمامی جدایه های آنفلوانزای حاد HPAI از تحت تیپ های H5 یا H7 هستند، اگرچه ویروس های این تحت تیپ ها لزوماً سبب HPAI نمی شوند (Swayne و همکاران، ۱۹۹۷؛ Zanella و همکاران ۲۰۰۱؛ Capuaو Alexander، ۲۰۰۶). این بیماری ها توسط دفتر بین المللی بیماری های همه گیر (OIE) در گروه A طبقه بندی شده اند (OIE، ۲۰۰۲).

بیماری آنفلوانزای پرندگان که توسط تحت تیپ H9N2 در پرندگان ایجاد می شود، طی سال های پایانی دهه ۱۹۹۰ به طور قابل ملاحظه ای در تمامی دنیا افزایش یافته است. واگیری هایی از تحت تیپ H9N2 در اردک های اهلی، جوجه و بوقلمون در طی ۱۹۹۵ و ۱۹۹۸ در آلمان، در جوجه در ایتالیا در ۱۹۹٤ و ۱۹۹٦، در قرقاول در ایرلند در ۱۹۹۷، در شترمرغ در افریقای جنوبی در ۱۹۹۵، بوقلمون در ایالات متحده امریکا در ۱۹۹۵ و ۱۹۹٦ و در جوجه در کره ی جنوبی در سال ۱۹۹٦ رخ داده است (Bano و همکاران، ۲۰۰۳؛ Capua و Alexander، ۲۰۰٤؛ Swayne و Slemons، ۱۹۹۸). در چند سال اخیر، ویروس های H9N2 در کشورهای خاور میانه گزارش شده اند که سبب مشکلات گسترده و جدی در جوجه در گله های تجاری در ایران، پاکستان، عربستان سعودی و امارات متحده عربی شده اند (Aamirو همکاران، ۲۰۰۷؛ Alexander،

۲۰۰۳؛ Banksو همکاران، ۲۰۰۰؛ Capuaو Alexander، ۲۰۰٤؛ Naeemو همکاران، ۱۹۹۹؛ نیلی و اساسی، ۲۰۰۲؛ وصفی مرندی و بزرگمهری فرد، ۲۰۰۲).

آنفلوانزای پرندگان به واسطه تحت تیپ H9N2، در مناطق درارای صنعت طیور با جمعیت متراکم در استان تهران شیوع یافته و سبب خسارات اقتصادی سنگینی در صنعت طیور در ۱۹۹۸ گردید. چون این ویروس های بسیار واگیر در گله های مادر سایر استان های کشور نیز گسترش یافته است، یک استراتژی واکسیناسیون با واکسن های غیر فعال شده H9N2 برای کنترل بیماری AI در صنعت طیور اتخاذ شد. با این وجود، برخی از واگیری ها ادامه یافته و سبب خسارات اقتصادی عظیمی در چندین گله گوشتی شد. تمامی ویروس های تحت تیپ H9N2 جدا شده از جوجه های واکسینه شده و واکسینه نشده تا کنون متعلق به nHPAI بوده اند (وصفی مرندی و همکاران، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۰؛ وصفی مرندی و بزرگمهری فرد، ۲۰۰۲ و ۱۹۹۹). اما افزایش میزان مرگ و میر بواسطه نفریت بینابینی شدید همراه با رسوب اورات، احتقان ریوی، تشکیل کست های اکسودایی در محل دوشاخه شدن نای در برخی گله های گوشتی عفونی شده با H9N2 یک سوال در مورد پاتوژنیسیته این بیماری مطرح می کند. این مطالعه برای بررسی علائم بالینی، حدت بیماریزایی، تغییرات هماتولوژیک، سرولوژیک، کالبدگشایی و هیستوپاتولوژیک جوجه های گوشتی دریافت کننده ماده ایمونوژن و بدون دریافت ایمونوژن که