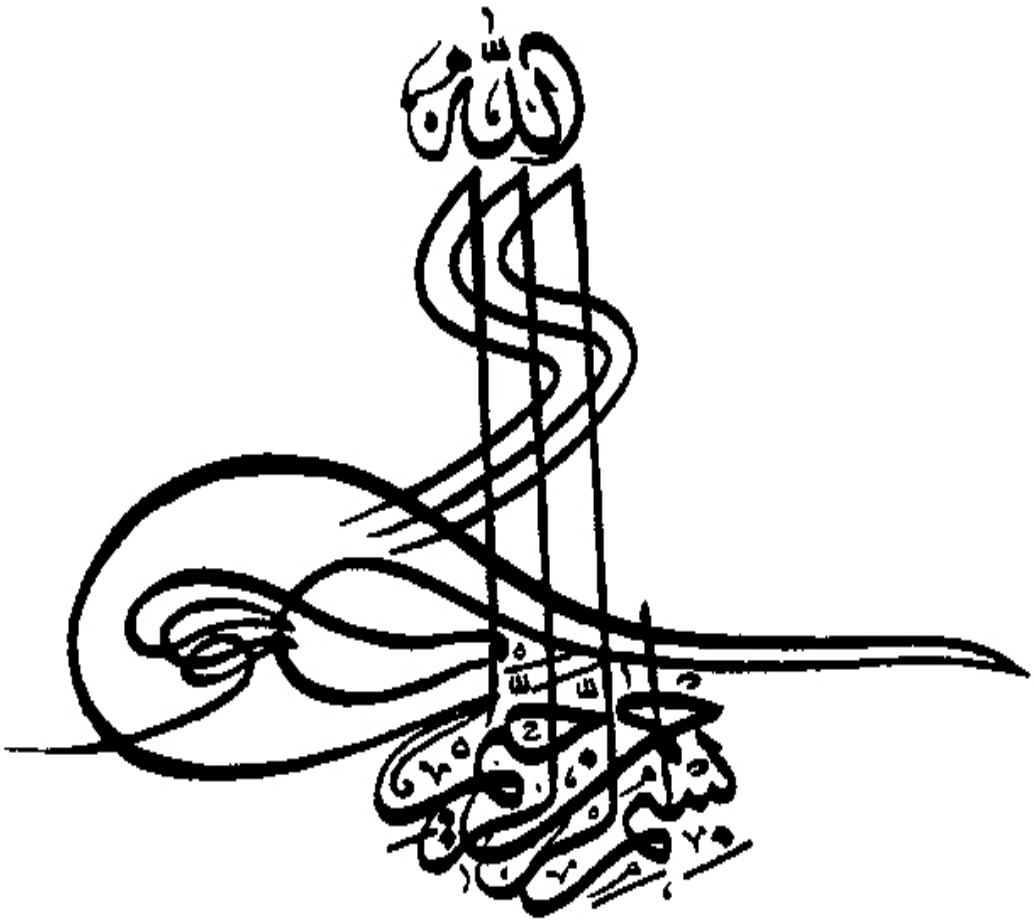
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده دامپزشکی
گروه پاتوبیولوژی
پایان نامه برای دریافت درجه دکترا حرفه ای در رشته دامپزشکی

عنوان پایان نامه:

مطالعه هیستوپاتولوژیک بیماریزایی جدایه‌های تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای تیپ A پرندگان در جوجه های گوشتی

استاید راهنما:

دکتر جواد اشرفی هلان

دکتر وحید کریمی

استاد مشاور:

دکتر جعفر پازانی

استاد داور:

دکتر امیرعلی شهبازفر

پژوهشگر:

محسن آسمند

آذرماه ۱۳۹۰

با درود به روان پاک پدر و خواهر عزیزم

تقدیم به

مادر فداکار و مهربانم

تقدیم به:

مادر عزیزم که قلبم سرشار از عشق و محبتش است، کسی کـه بعـد از خداوند متعال هرچه در زندگی دارم از اوست.

برادر عزیزم محمدرضا که همواره صمیمانه حامی و پشتیبانم بـوده و همسرمحترمش که در طی‌سالهای تحصیل‌مشوق و امیدبخش من بود

برادر عزیزم حمیدکه همیشه صمیمانه کمک حال و یاریگرم بوده

محمدآرمان، عزیزترین دلبندمان که وجودش شادی بخـش زنـدگی من و خانواده ام است

با تقدیر و تشکر از:

استاد دانشمند و محبوبم

جناب آقای دکتر جواد اشرفی هلان

به عنوان استاد راهنمای اول

که همواره از لحاظ علمی و اخلاقی برای بنده الگو بودند شاگردی در محضر ایشان را برای خود مایه افتخار و مباهات می دانم و همیشه قدردان راهنمایی ها و ارشادگری های ارزشمندشان خواهم بود

با تقدیر و تشکر از:

استاد فرزانه و ارجمندم

جناب آقای دکتر وحید کریمی

به عنوان استاد راهنمای دوم

که با اخلاق نیکو و راهنمایی با ارزش خود هدایتگر بنده در انجام این تحقیق بودند

با تقدیر و تشکر از:

استاد فرهیخته و گرانقدرم

جناب آقای دکتر جعفر پازانی

به عنوان استاد مشاور

که با دانش ارزنده شان کمک شایانی در طراحی و پیشبرد این تحقیق نمودند و با لطف و راهنمایی شایسته خود نقش بسزائی در اشتغال بنده در شرکت سواپارس داشتند

با تقدیر و تشکر از:

استاد نمونه و ارزشمندم

جناب آقای دکتر امیر علی شهباز فر

به عنوان استاد داور

که افتخار تلمذ و شاگردی در محضر ایشان برای بنده بسیار لذت بخش و خاطره انگیز بود

با سپاس فراوان از:

- کلیه اساتید عزیزم، کارمندان ارجمند بویژه جناب آقای حقی و کارکنان محترم دانشکده دامپزشکی تبریز که در امر تحصیل و آموزش بنده زحمت کشیدند

- تمام دوستان و همکلاسی های عزیزم که افتخار همراهی و رفاقت با آنان را داشتم بویژه خانم دکتر رضایی و آقای دکتر اصل نجاری که در ارائه این پایان نامه صمیمانه به بنده یاری رساندند

- کارمندان وکارکنان محترم بیمارستان دانشکده دامپزشکی تهران به ویژه جناب آقای مهندس سلیمانی که در انجام این تحقیق کمک شایانی نمودند

- جناب آقای دکتر حسینی و جناب آقای دکتر برین که بواقع بدون کمک این عزیزان انجام این پژوهش به سادگی امکانپذیر نبود

تشکر ویژه از:

- جناب آقای مهندس زرین، مدیر عامل شرکت سواپارس (نماینده انحصاری شرکت سوا فرانسه در ایران) که همواره به بنده لطف و عنایت داشتند
- سرکار خانم دکتر حصاری و جناب آقای دکتر همایونی‌مهر که با نظرات و راهنمایی های ارزنده خود، نقش مهمی در ارائه هر چه بهتر این تحقیق ایفا نمودند
- کلیه همکاران در شرکت سواپارس بخصوص سرکار خانم لاهوری که مساعدت داشتند

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 اول) صورت پذیرفته است و بدین ترتیب مراتب تشکر و

قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اعلام می نمایم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

پیشگفتار ۱

۱- کلیات ۵

۱-۱- تاریخچه ۵

۱-۲- تحت تیپ H9N2 آنفلوانزا تیپ A ٦

۱-۲-۱- تحت تیپ H9N2 در دنیا ٦

۱-۲-۲- تحت تیپ H9N2 در ایران ۹

۱-۳- اهمیت آنفلوانزای پرندگان در بهداشت عمومی ۱۱

۱-٤- اهمیت اقتصادی بیماری ۱۲

۱-۵- سبب شناسی بیماری ۱۳

۱-۵-۱- ویروس آنفلوانزا و شناخت بیشتر آن ۱۵

۱-۵-۲- مراحل تکثیر ویروس آنفلوانزا ۱۸

۱-۵-۲-۱- اتصال ۱۸

۱-۵-۲-۲- ورود و پوشش برداری ویروس ۱۹

۱-۵-۲-۳- نسخه برداری و ترجمه ۲۰

۱-۵-۲-٤- آزاد شدن ویروس از سلول ۲۱

۱-۵-۳- تغییرات آنتی ژنی ۲۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۵-۳-۱- تغییرات جزئی آنتی ژنی ۲۳

۱-۵-۳-۲- تغییرات کلی آنتی ژنی ۲٤

۱-۵-٤- مقاومت در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی..... ۲۵

۱-۵-٤-۱- پایداری ویروس در شرایط مزرعه و آزمایشگاه :..... ۲۵

۱-۵-۵- طبقه بندی ویروس آنفلوانزا بر اساس بیماریزایی ۲۷

۱-۵-٦- پلیمراز ویروس آنفلوانزای A، تعیین کننده طیف میزبانی و قدرت بیماریزایی..... ۲۹

۱-٦- میزبان های آزمایشگاهی ویروس آنفلوانزا ۳۱

۱-۷- بیماریزائی ویروس آنفلوانزا..... ۳۲

۱-۷-۱- دوره نهفته ۳٦

۱-۷-۲- بیماریزائی ۳۷

۱-۸- علائم بالینی بیماری آنفلوانزا ۳۹

۱-۸-۱- علائم بالینی عفونت های ناشی از ویروسهای کم حدت (LPAI)..... ٤۰

۱-۸-۲- علائم بالینی عفونت های ناشی از ویروسهای باحدت بالا ٤۲

۱-۹- علایم و جراحات کالبد گشایی آنفلوانزای طیور..... ٤٤

۱-۱۰- علایم هیستوپاتولوژیک آنفلوانزای طیور ٤۸

۱-۱۱- ایمنی..... ۵۳

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۱۲- جداسازی و تشخیص ٥٤

۱-۱۲-۱- جمع آوری کردن نمونه ها ٥٤

۱-۱۲-۲- جداسازی و تکثیر ویروس ٥٧

۱-۱۲-۳- شناسایی ویروس ٥٨

۱-۱۲-۳-۱- آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)..... ٥٩

۱-۱۲-۳-۲- تعیین تیپ ویروس آنفلوانزا..... ٥٩

۱-۱۲-۳-۳- تعیین تحت تیپ ویروس آنفلوانزا..... ٦٠

۱-۱۲-۳-٤- تشخیص مستقیم ویروس ٦١

۱-۱۲-۳-٥- روش های سرولوژی ٦٢

۲- مواد و روش کار..... ٦٣

۲-۱- تهیه و تکثیر ویروس..... ٦٣

۲-۲- جوجه های مورد آزمایش..... ٦٣

۲-۳- طرح آزمایش..... ٦٤

۲-٤- آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون(HI)..... ٦٥

۲-٥- روش استخراج RNA از نمونه بافت..... ٦٦

۲-٥-۱- آزمایش نسخه برداری معکوس (RT) ٦٦

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-٦- آزمایش الایزا ٦٧

۳-۷- آزمایش آگلوتیناسیون سریع سرم (Rapid Serum Aglutination) (RSA) ٦٨

۳-۸- آزمایش هیستوپاتولوژی ٦٨

۳-۹- کشت ٦٩

۳- نتایج ۷۰

۳-۱- محاسبه ضریب بیماریزایی داخل وریدی(IVPI) ۷۰

۳-۲- نتایج مشاهدات بالینی ۷۱

۳-۳- نتایج مشاهدات کالبدگشایی ۷۲

٤-۳- نتایج حاصل از آزمایشات سرمی ۷٤

٤-٤- نتایج حاصل از شناسایی ویروس ۷٥

٤-٥- نتایج هیستوپاتولوژی ۷٦

٤-٥-۱- نتایج هیستوپاتولوژی ویروس A/Chicken/Iran/TH85/2006(H9N2): ۷٦

٤-٥-۱-۱- نای و ریه ۷٦

٤-٥-۱-۲- کلیه ۷۷

٤-٥-۱-۳- بورس فابرسیوس ۷۷

٤-٥-۱-٤- تیموس ۷۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

٤-٥-١-٥- پانکراس ٧٩

٤-٥-١-٦- کبد ٨٠

٤-٥-١-٧- سیستم اعصاب مرکزی ٨١

٤-٥-١-٨- لوله گوارش ٨١

٤-٥-١-٩- طحال ٨٣

٤-٥-١-١٠- قلب ٨٣

٤-٥-٢- نتایج هیستوپاتولوژی ویروس A/Chicken/Iran/TH286/2007(H9N2): ٨٤

٤-٥-٢-١- نای و ریه ٨٤

٤-٥-٢-٢- کلیه ٨٦

٤-٥-٢-٣- بورس فابرسیوس ٨٦

٤-٥-٢-٤- تیموس ٨٧

٤-٥-٢-٥- پانکراس ٨٨

٤-٥-٢-٦- کبد ٨٩

٤-٥-٢-٧- سیستم اعصاب مرکزی ٩٠

٤-٥-٢-٨- لوله گوارش ٩٠

٤-٥-٢-٩- طحال ٩٢

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

٤-٥-٢-١٠- قلب ٩٢

٤-٥-٣- نتایج هیستوپاتولوژی گروه شاهد..... ٩٢

٤-٦- نتایج کشت..... ٩٢

٤- بحث..... ٩٣

منابع ١٠٠

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۱- خسارات اقتصادی وارد شده بدنبال درگیری با ویروسهای بسیار بیماریزا (HP) و کم بیماریزا (LP) آنفلوانزای پرندگان ۱۳

جدول۲-۱- نقش پروتئینهای ویروس آنفلوانزا همراه با سایر مشخصات مربوطه..... ۱۳

جدول شماره۱-۳- جدول محاسبه IVPI در مورد گروه آزمایش جوجه های ۳۰ روزه تلقیح شده با ویروس A/Chicken/Iran/TH85/2006(H9N2) به روش IV ۷۰

جدول شماره۲-۳- جدول محاسبه IVPI در مورد گروه آزمایش جوجه های ۳۰ روزه تلقیح شده با ویروس A/Chicken/Iran/TH286/2007(H9N2) به روشIV..... ۷۱

جدول شماره۳-۳- جدول محاسبه IVPI در مورد گروه شاهد جوجه های ۳۰ روزه ۷۱

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر۱-۱- ویروس آنفلوانزا A خالص شده A/WSN/33. رنگ آمیزی منفی با اسید فسفوتنگستیک ۲٪ ۱۳

تصویر۱-۳- تورم و پرخونی شدید در بافت کلیه همراه با رسوب اورات (گروه چالش با ویروس TH85) ۷۳

تصویر۲-۳- پرخونی و تورم شدید همراه با درجاتی از رسوب اورات در کلیه (پیکان) (گروه چالش با ویروس TH85) ۷۳

تصویر۳-۳- تورم و پرخونی شدید در کلیه ها همراه با رسوب اورات(پیکان) (گروه چالش با ویروس TH286) ۷٤

تصویر٤-۳- التهاب کانونی (پیکان پایین) همراه با پرخونی و خونریزی گسترده در نای (پیکان بالا) ۷٦

تصویر٥-۳- نفریت بینابینی(پیکان بالا) کلیه همرا با پرخونی شدید(پیکان پایین) ۷۷

تصویر٦-۳- تخلیه لنفوسیتی همراه با نمایان شدن لایه اپیتلیوم بین ناحیه قشری و مرکزی فولیکول (پیکان) ۷۸

تصویر۷-۳- پرخونی شدید و التهاب همراه با نفوذ هتروفیل ها و تشکیل میکروآبسه در تیموس(پیکان) ۷۹

تصویر۸-۳- نکروز همراه با نفوذ شدید سلول های التهابی در بخش اگزوکرین پانکراس (پیکان) ۸۰

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر۹-۳- التهاب کانونی همراه با پرخونی درکبد(پیکان) ۸۱

تصویر۱۰-۳- نفوذ سلول های التهابی در ناحیه پارین پیش معده ۸۲

تصویر۱۱-۳- نفوذ سلول های التهابی چند هسته ای(PMN) همراه با پرخونی طحال..... ۸۳

تصویر۱۲-۳- آندوکاردیت کانونی همراه با پرخونی قلب(پیکان) ۸٤

تصویر۱۳-۳- تجمع کانونی سلول های التهابی در پرده جنب(پیکان)..... ۸۵

تصویر۱٤-۳- نفریت بینا بینی همراه با پرخونی در بافت کلیه (پیکان)..... ۸٦

تصویر۱۵-۳- تخلیه لنفوسیتی نسبتا شدید و نمایان شدن لایه اپیتلیوم بین ناحیه قشری و مرکزی فولیکول ها ۸۷

تصویر۱٦-۳- کانون های پرخونی و خونریزی(پیکان بالا) تخلیه لنفوسیتی ها در تیموس (پیکان پایین) ۸۸

تصویر۱۷-۳- نفوذ سلول های التهابی همراه با نکروز پانکراس..... ۸۹

تصویر۱۸-۳- کلانژیوهپاتیت در کبد ۸۹

تصویر۱۹-۳- التهاب و تجمع کانونی سلول های التهابی در مجاورت غدد موکوسی مری (پیکان) ۹۰

تصویر۲۰-۳- التهاب کانونی غدد پیش معده(پیکان) ۹۱

نام خانوادگی دانشجو: آسمند **نام:** محسن

عنوان پایان نامه:

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

اساتید راهنما : دکتر جواد اشرفی هلان – دکتر وحید کریمی

استاد مشاور: دکتر جعفر پازانی

مقطع تحصیلی : دکترای حرفه ای **رشته** : دامپزشکی **دانشگاه:** تبریز

دانشکده : دامپزشکی تاریخ فارغ التحصیلی :۱۳۹۰/۹/۲۱ تعداد صفحات :۷۵

کلید واژه : ویروس آنفلوانزا، تحت تیپ H9N2 ، هیستوپاتولوژی، جوجه های گوشتی

چکیده :

از تابستان سال ۱۳۷۷ که درگیری صنعت مرغداری کشور با تحت تیپ H9N2 ویروس های آنفلوانزای پرندگان مشخص شد این ویروس همواره در درگیری های مزرعه ای، متفاوت از شرایط آزمایشگاهی ظاهر شده و مانند یک ویروس با حدت بالا عمل کرده و باعث ضررهای اقتصادی فراوانی شده هرچند در شرایط آزمایشگاهی ضریبی معادل ضریب بیماریزایی داخل وریدی ویروس های غیر بیماریزا را داشته است. به نظر می رسد در حضور عفونت های ثانویه بخصوص کلی باسیلوز، مایکوپلاسموز و برونشیت عفونی شدت بیماری حاصل بسیار بیشتر بوده است. هدف از این مطالعه، تلقیح دو سویه از ویروس تحت تیپ H9N2 جدا شده از کلیه جوجه های گوشتی در ایران با نام های A/Chicken/Iran/TH85/2006(H9N2) و A/Chicken/Iran/TH286/2007(H9N2)، به جوجه های ۳۰ روزه به روش داخل وریدی (IV) بود. ضریب بیماریزایی داخل رگی این دو ویروس زیر یک بود. در روز دوم بعد از تلقیح علائم بالینی شامل اسهال، کزکردگی، بی حالی، سیخ شدن پرهای پشت گردن، افسردگی و به میزان کمتر علائم تنفسی نظیر عطسه، سرفه و گاهی تغییر در صداهای تنفسی مشاهده شد. در کالبدگشایی جوجه ها، پرخونی شدید ریه، خونریزی و کست در محل دو شاخه شدن نای، نفریت بینابینی و رسوب اورات در کلیه، پرخونی، تورم و خونریزی های کانونی در بورس فابرسیوس، پرخونی و خونریزی در تیموس، پرخونی طحال و پرخونی عمومی لاشه مشاهده شد. در مطالعه هیستوپاتولوژیک، پرخونی شدید ریه ها و مجاری هوایی، پرخونی و نفریت بینابینی کانونی در کلیه، تخلیه جمعیت لنفوسیت ها در تیموس و بورس فابرسیوس، پرخونی و التهاب کانونی بخش اگزوکرینی و آندوکرینی پانکراس، تورم چرکی حاد شدید در پیش معده، راکتیو شدن کبد همراه با کانون های التهاب، پرخونی بافت مغز و مننژ، میوکاردیت و آندوکاردیت کانونی و مشاهده شد. در مطالعه حاضر ضایعات بافت های مختلف نشان دهنده آن است سویه های مورد مطالعه از تحت تیپ H9N2 علاوه بر تروپیسم ویروس به دستگاه تنفس و دستگاه ادراری که در مطالعات قبلی به اثبات رسیده بود. توانایی تهاجم و تکثیر در بافت هایی نظیر پیش معده، بافت های لنفاوی، قلب و نظایر آن را دارند که با توجه به گستردگی شیوع آن در بین مرغداری های کشور، تهدید بهداشتی مهمی برای سلامتی افراد انسانی درمعرض تماس باشد.

پیشگفتار

آنفلوانزای پرندگان یکی از بیماریهای بسیار مهم جوامع انسانی و پرندگان می باشد که توسط ویروس آنفلوانزای A متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده ایجاد می‌شود (۱). عامل این بیماری بسیار واگیر، در دستگاه تنفس، گوارش و اعصاب جایگزین شده و گاهی در طیور مرگ و میر بسیار شدیدی ایجاد می‌ماید. این ویروس در طیور علاوه بر دستگاه تنفس، گوارش و اعصاب در دستگاه تولید مثل نیز جایگزین شده و باعث کاهش تولید در کنار سایر علائم بالینی می شوند (۲و۳). ژنوم ویروس های آنفلوانزا حاوی RNA و از ۸ قطعه مجزا تشکیل شده است. به همین دلیل شیوع بسیار بالای بازآرایی ژنتیکی از مشخصات بارز این ویروس ها بوده و تغییرات پادگنی ناشی از آن در گلیکوپروتئین های سطحی ویروس به عنوان سدی بزرگ در راه کنترل و پیشگیری بیماری آنفلوانزا بحساب می آید. بر اساس پادگن نوکلئوکپسید یا ماتریکس، ویروس های آنفلوانزا به ۳ تیپ A، B و C طبقه بندی می شود که تیپ A عامل اکثر همه گیری های آنفلوانزا در طیور، دام ها و همچنین عامل مرگ میلیون ها انسان در قرن گذشته بوده و در سایر پستانداران پست تر نیز عامل ایجاد بیماری بوده است(٤). ویروس های فوق دارای ۲ دسته آنتی ژن سطحی هماگلوتینین(HA) و نورآمینیداز(NA) می باشند که علاوه بر اهمیت آنها در روند بیماریزایی و ایمنی زایی در تعیین تحت تیپ های ویروس آنفلوانزا نیز به عنوان شاخصه اصلی مدنظر قرار می گیرند به نحوی که تاکنون ١٦ تحت تیپ آنتی ژن H و ۹تحت تیپ آنتی ژنN شناسایی گردیده و مبنای نامگذاری تحت تیپ ها گردیده است (۵). این ویروس ها به دو گروه شامل ویروس‌های آنفلوانزای با قدرت بیماریزایی نه چندان زیاد (nHPAI) و ویروس های آنفلونزای با بیماریزایی بسیار بالا