

## ارزیابی تروپیسیم بافتی و بیماری‌زایی سه جدایه ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زای خاص

محمد اسلام پناه<sup>۱</sup>، نجمه معتمد<sup>۲\*</sup>، حمید شوشتری<sup>۳</sup>

- ۱- بخش پاتولوژی و اپیدمیولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۲- بخش تحقیق و تولید واکسن و فراورده‌های بیولوژیک طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۳- بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۹ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۳ خرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۶ خرداد ۱۴۰۱

### چکیده

تحت تیپ H9N2 آنفلوانزای پرندگان جزو ویروس‌های مهم از نظر اقتصادی در صنعت طیور خاورمیانه بوده و در ایران نیز به صورت اندمیک شده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی تروپیسیم بافتی و بیماری‌زایی ۳ جدایه مختلف از ویروس H9N2 انجام شد. بدین منظور ۸۴ جوجه یک روزه SPF به طور تصادفی به چهار گروه مساوی (۲۱ جوجه در هر گروه) در ایزولاتورهای جداگانه با فشار هوای مثبت تقسیم شدند. جوجه‌های ۳۰ روزه در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ با EID<sub>50</sub> ۱۰<sup>۶</sup> از سه ویروس H9N2 جدا شده در سال‌های مختلف از مرغداری‌های گوشتی ایران به روش چشمی-بینی تلقیح شدند، گروه چهارم به‌عنوان شاهد با مایع آلانتوئیک تلقیح شدند. در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ پس از تلقیح نمونه‌ها شامل سواب کلواکی، سواب حلقی-دهانی و بافت‌های مختلف جمع‌آوری شدند. از روش Real-time PCR برای شناسایی ویروس در نمونه‌های بافت و سواب استفاده شد. ویروس H9N2 در تمام بافت‌ها در روزهای ۲، ۴ و ۶ پس از تلقیح به استثنای کبد و تیموس شناسایی شد. حداکثر ضایعات هیستوپاتولوژیک نای، ریه، کبد، کلیه، طحال، لوزه سکوم و تیموس در روزهای ۲ تا ۸ مشاهده گردید. ضایعات در سایر بافت‌ها از جمله لوزه‌های سکومی و کلواک چندان برجسته نبود. در بررسی ایمونوهیستوشیمی، وجود آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا در سلول‌های اپیتلیال بافت‌های ریه، کلیه و روده در روزهای ۴ و ۶ پس از تلقیح مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده شدت بیماری‌زایی سه ویروس مورد مطالعه تقریباً مشابه، کم و فاقد تلفات با علائم خفیف تنفسی و دیرسیون بود. با این حال دیده شده که علی‌رغم بیماری‌زایی کم ویروس‌های H9N2 تظاهر علائم بالینی عفونت با این ویروس در گله‌های تجاری بسیار متغیر و بعضاً با تلفات و خسارات اقتصادی مهمی همراه است.

**واژگان کلیدی:** ویروس آنفلوانزای پرندگان، واکنش زنجیره پلی‌مرز در زمان واقعی، بیماری‌زایی، هیستوپاتولوژی، ایمونوهیستوشیمی

## مقدمه

از اوایل دهه ۱۹۹۰ ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 به یکی از شایع‌ترین ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در طیور در بسیاری از نقاط جهان مبدل شد. اگرچه این ویروس به‌عنوان ویروس‌های آنفلوانزای با بیماری‌زایی کم طبقه‌بندی می‌شود و عموماً ممکن است باعث بیماری خفیف تا متوسط شود، اما گاهی با عوارض و مرگ و میر قابل‌توجهی در پرندگان حساس به‌ویژه در نتیجه عفونت‌های همزمان مانند اشریشیاکلی همراه است. علیرغم واکسیناسیون گسترده، این ویروس باعث خسارات اقتصادی مهمی در صنعت طیور می‌شود (۱). علاوه بر این، در سال ۱۹۹۸، ویروس H9N2 از کودکی با علائم آنفلوانزا در چین جدا شد که بیانگر ماهیت زئونوز بودن ویروس H9N2 و توانایی ویروس برای عبور از سد بین گونه‌ای است. این ویروس متعلق به خانواده Orthomyxoviridae است و بر اساس تفاوت آنتی‌ژنی بین ژن‌های نوکلئوپروتئین و ماتریکس به انواع A، B، C و اخیراً D طبقه‌بندی می‌شود. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A که در پرندگان و برخی پستانداران و انسان بیماری‌زا هستند بر اساس دو گلیکوپروتئین سطحی به نام‌های هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) به تحت‌تیپ‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند. در حال حاضر، ۱۶ تحت‌تیپ هماگلوتینین (H1-H16) و ۹ تحت‌تیپ نورآمینیداز (N1-N9) در پرندگان شناسایی شده‌است. دو تحت‌تیپ (H17، H18) از ویروس‌های آنفلوانزای A در خفاش‌ها در گواتمالا شناسایی شده‌اند (۲). ویروس‌های آنفلوانزای با بیماری‌زایی کم (LPAI) حاوی آمینو اسید مونوبازیک (آرژنین) در محل برش هستند و فقط می‌توانند در بافت‌های تنفسی و دستگاه گوارش تکثیر شوند. بیماری‌زایی ویروس متغیر است و به وجود سایر عوامل بیماری‌زا و شرایط محیطی

بستگی دارد. گزارش‌های مختلفی در مورد شدت بیماری‌زایی H9N2 منتشر شده‌است (۳). در آسیای شرقی ویروس‌های H9N2 بدون هیچ بیماری قابل تشخیصی جدا شدند (۴) و ویروس کره‌ای H9N2 باعث بیش از ۳۰ درصد مرگ و میر و کاهش تولید تخم پس از آلودگی آزمایشی جوجه‌های SPF شد (۵). در مطالعات تجربی ایران و پاکستان، بیماری‌زایی H9N2 و مرگ و میر غیرعادی گزارش شده‌است (۶، ۷).

در مطالعه‌ای در کشور اردن سال ۲۰۰۸، ویروس H9N2 در جوجه‌های گوشتی بیشتری و شدیدتر از جوجه‌های SPF ضایعات در دستگاه تنفسی ایجاد کرده بود (۸). در حال حاضر اطلاعات زیادی در مورد بیماری‌زایی ویروس‌های H9N2 وجود ندارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی علائم بالینی، ضایعات کالبدگشایی، ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی سه ویروس H9N2 به دنبال تلقیح داخل چشمی بینی (*Occulo-nasal*) تحت شرایط کنترل شده در جوجه‌های SPF بود.

## مواد و روش‌ها

**ویروس:** سه جدایه ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2، A/ck/Iran/96/102/2016، A/ck/Iran/92/1/2013، A/ck/Iran/89/51/2010 جدا شده از طغیان‌های آنفلوانزا و در سال‌های متفاوت از مرغداری‌های صنعتی در ایران از آزمایشگاه تشخیص بیماری‌های پرندگان مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انتخاب شدند. بر اساس آنالیز مولکولی این جدایه‌ها همه متعلق به تحت تیپ H9N2 آسیایی بودند، در ادامه این ویروس‌ها به ترتیب به نام‌های: ایزوله ۹۶، ۹۲ و ۸۹ معرفی می‌گردند. سه جدایه انتخاب شده ابتدا در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار SPF ۹ الی ۱۱ روزه تکثیر

از هر گروه به‌طور تصادفی آسان کشی شدند. پس از کالبدگشایی ضایعات ماکروسکوپیک ثبت و نمونه‌های بافتی شامل: نای، ریه، کلیه، تیموس، کبد، بورس فابریسیوس، طحال و لوزه سکومی از گروه‌های کنترل و آزمایش جمع‌آوری شد و هر بافت در دو قسمت یکی به منظور انجام تست‌های مولکولی و قسمت دوم در بافر فرمالین ۱۰ درصد و به جهت انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی فیکس شدند. تمام مراحل تحقیق مطابق با اصول کمیته نظارت بر اخلاق حیوانات و کمیته رفاه حیوانات مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شد.

**آنالیز مولکولی:** از ۲۰۰ میکرولیتر از محیط سوآب و سوسپانسیون ۲۰ درصد نمونه‌های بافتی با کیت اسید نوکلئیک ویروسی با خلوص بالا RNA ویروس (روش، آلمان) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. RNA های ویروسی استخراج شده در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با آب عاری از RNase تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

توالی جفت پرایمر و پروب طراحی شده برای نواحی حفاظت شده HA2 ژن هم‌گلویتینین تحت تیپ (9) H9 که قبلاً گزارش شده در جدول ۱ ذکر شده اند.

شدند و برای تعیین EID50 آنها پس از تهیه رقت‌های سریالی  $10^{-1}$  الی  $10^{-9}$  از هر ویروس، ۰/۲ میلی‌لیتر از هر رقت به تخم‌مرغ جنین‌دار عاری از عوامل پاتوژن خاص ۹-۱۱ روزه تزریق و پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز با روش اسپیرمن کاربر (Spearman-Karber) ارزیابی شدند.

**طرح آزمایش:** هشتاد و چهار جوجه ۱ روزه سفید لگهورن عاری از عوامل پاتوژن خاص (SPF) (شرکت ونکیز، هند)، به طور تصادفی به چهار گروه (۲۱ جوجه در هر گروه) تقسیم و در ایزولاتورهای با فشار هوای مثبت جداگانه نگهداری شدند. در طول آزمایش دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. در سن ۳۰ روزگی جوجه‌های ۳ گروه با تیتراژ EID50  $10^6$  در ۱۰۰ میکرولیتر و به روش داخل چشمی - بینی از هر ایزوله H9N2 تلقیح شدند، گروه چهارم به‌عنوان کنترل منفی و شاهد با ۰/۱ میلی‌لیتر مایع آلتوتوئیک عاری از ویروس تلقیح شدند.

جوجه‌های هر گروه روزانه از نظر وجود علائم بالینی و یا تلفات احتمالی ارزیابی می‌شدند. در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ پس از تلقیح (dpi)، سوآب‌های حلقی-دهانی و کلوآکال برای آنالیز مولکولی جمع‌آوری شد و هر نوبت سه قطعه جوجه

جدول ۱- توالی جفت پرایمر و پروب طراحی شده برای آزمایش RT-PCR

Target	Primer/probe	Sequence (5' to 3')
HA2 H9	H9-Forward	CCTGCTAGATCAAGTAGAG
	H9-Reverse	GAGTTGAATCCCTATCTGCA
	H9 probe	FAM-CATAGCTGGATTCATAGAAGGAGGTT-TAMARA

استفاده شد (Hilden, Qiagen, آلمان). RT-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از (Corbett (RotorGene 3000، استرالیا) انجام شد. سیکل حرارتی RT-PCR به منظور تشخیص ژن H9 به شرح ذیل بود: ابتدا مرحله رونوشت‌برداری معکوس (RT) به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ چرخه دمایی شامل ۱۵ ثانیه دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد.

#### هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی: برای

بررسی هیستوپاتولوژیک، نای، ریه، تیموس، لوزه سکومی، بورس فابریسیوس، طحال، کبد و کلیه از هر جوجه جمع‌آوری و در بافر فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. پس از پارافینه شدن بافت‌ها، قطعات بافتی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر بریده و با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند.

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی بر روی نمونه‌های ریه و کلیه انجام شد. برای تشخیص آنتی‌ژن ویروس، از کیت تشخیصی تجاری ایمونوهیستوشیمی (ABC) (HRP/DAB اختصاصی موش Abcam.ab64259، ایالات متحده آمریکا) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. پس از پارافین زدایی و هیدراتاسیون توسط زایلن/اتانول چند قطره پراکسید هیدروژن برای بلوک کردن پراکسید داخل بافتی اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد، ۲ بار در بافر (تریس فسفات سالین) TBS شسته شد. محلول بلوک پروتئین اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمایی اتاق انکوبه شد تا از رنگ‌آمیزی غیر اختصاصی پس‌زمینه جلوگیری شود. مجدد لام‌ها ۲ بار در بافر TBS شسته شدند. احیا و بازیابی آنتی‌ژن در سیترات سدیم به مدت ۵ دقیقه و در مایکروویو انجام و سپس دو بار شستشو با TBS. آنتی‌بادی اولیه ضد نوکلئوپروتئین آنفولانزای تیپ A تهیه شده در موش (ab20343 [AA5H]

(abcam) اضافه و لام‌ها در طول شب در دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۴ بار شستشو در بافر TBS. ایمنوگلوبولین جی (IgG) ضد موش بیوتینیل‌تهیه شده در بز به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمایی اتاق انکوبه شدند. پس از شستشو در بافر TBS استریپتاویدین پراکسیداز اضافه و ۱۰ دقیقه دیگر انکوبه شد. ۲۰ لاندا کروموژن DAB روی اسلایدها ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند پس از شستشو در بافر در نهایت از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین به‌عنوان counterstain و رنگ زمینه صورت گرفت.

#### نتایج

**علائم بالینی:** در جوجه‌های گروه شاهد و جوجه‌های تلقیح شده با ایزوله ۹۶ علائم بالینی مشاهده نشد، اما در جوجه‌های آلوده به ایزوله ۹۲ دپرسیون، خمودگی، تجمع اطراف منبع گرما و چرت زدن در روز دوم پس از تلقیح در یک جوجه مشاهده شد. در گروه ایزوله ۸۹ در روز چهارم پس از تلقیح، دپرسیون، خمودگی، چرت زدن در یک جوجه مشاهده شد.

**ضایعات کالبدگشایی:** تمام اندام‌های داخلی در گروه کنترل نرمال بود. در گروه تلقیح شده با ایزوله ۹۶، التهاب متوسطی در ریه یک جوجه مشاهده شد. هیپرمی و احتقان خفیف در پانکراس در یک جوجه در گروه ۹۲ مشاهده شد. در گروه ۸۹ ظاهر غیر طبیعی مشاهده نشد.

**نتایج مولکولی:** نمونه‌های گروه کنترل همگی از لحاظ ویروسی منفی بودند. نمونه‌های مثبت بین روز دوم تا روز هشتم پس از تلقیح مشاهده شد. نمونه‌های مثبت در روز چهارم یا ششم بیشتر از سایر زمان‌های نمونه‌برداری پس از تلقیح بود. بافت تیموس و کبد از نظر وجود ژنوم ویروس در بافت منفی بودند. (جدول ۲ و ۳).

جدول ۲- نتایج نمونه‌های سواب حلقی دهانی و کلوک در گروه‌های تلقیح شده با سه جدایه ویروس H9N2

روز پس از تلقیح	گروه	سواب حلقی دهانی		سواب کلوک		درصد نمونه مثبت (%)
		تعداد نمونه مثبت/کل نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت/کل نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت/کل نمونه‌ها	تعداد نمونه مثبت/کل نمونه‌ها	
۲	۹۶	۲/۶	۳۳	۰/۶	۰	۰
	۹۲	۱/۶	۱۶	۰/۶	۰	۰
	۸۹	۲/۶	۳۳	۰/۶	۰	۰
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۴	۹۶	۴/۶	۶۶	۳/۶	۵۰	۵۰
	۹۲	۵/۶	۸۳	۵/۶	۸۳	۸۳
	۸۹	۴/۶	۶۶	۴/۶	۶۶	۶۶
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۶	۹۶	۱/۶	۱۶	۳/۶	۵۰	۵۰
	۹۲	۱/۶	۱۶	۳/۶	۵۰	۵۰
	۸۹	۲/۶	۳۳	۲/۶	۳۳	۳۳
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۸	۹۶	۰/۶	۰	۲/۶	۳۳	۳۳
	۹۲	۰/۶	۰	۱/۶	۱۶	۱۶
	۸۹	۰/۶	۰	۱/۶	۱۶	۱۶
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۱۰	۹۶	۰/۶	۰	۱/۶	۱۶	۱۶
	۹۲	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
	۸۹	۰/۶	۰	۱/۶	۱۶	۱۶
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
۱۲	۹۶	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
	۹۲	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
	۸۹	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰
	کنترل	۰/۶	۰	۰/۶	۰	۰

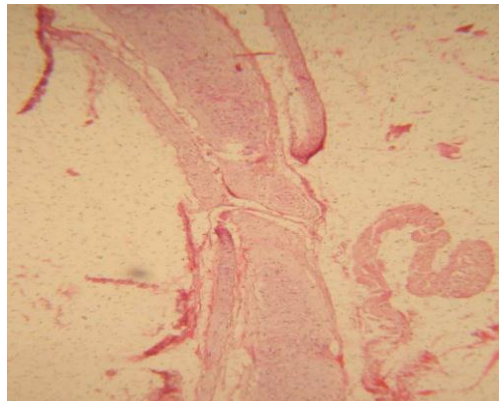
جدول ۳- نتایج مولکولی مقایسه‌ای بافت‌های نمونه‌گیری شده در جوجه‌های تلقیح شده با سه جدایه ویروس H9N2

گروه‌یافت	روز پس از تلقیح																							
	۲				۴				۶				۸				۱۰				۱۲			
کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل	۹۶	۹۲	۸۹	کنترل
نای	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
ریه	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
بورس	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
کبد	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
طحال	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
لوزه	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
سکومی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
تی‌موس	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## هیستوپاتولوژی

**نای:** نوع یافته‌های میکروسکوپی در جدایه‌های مورد مطالعه تقریباً مشابه بود، اما شدت و ماندگاری ضایعات بین جدایه‌ها تا حدودی متفاوت بود. یافته‌های میکروسکوپی در ایزوله ۹۶ شامل: پرخونی، احتقان، تخریب و کنده شدن اپیتلیوم و از بین رفتن مژک‌های تنفسی و ادم در روزهای ۲ و ۴

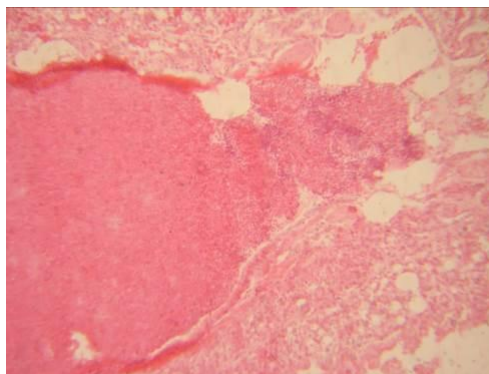
و کمی شدیدتر در روز ۶ بود. در روز ۸ شدت آن کاهش و در روزهای ۱۰ و ۱۲ فرایند بهبود آغاز شده بود. در ایزوله‌های ۹۲ و ۸۹ ضایعه از روز ۲ شروع شد و در روز ۴ کمی شدیدتر بود. در روز ۶ شدت ضایعات رو به کاهش بود که در روزهای ۸-۱۰ و ۱۲ همچنان کاهش داشت. (عکس ۱).



شکل ۱- نای: ۶ dpi، پرخونی، احتقان، لایه برداری، پوسته پوسته شدن، ریزش قابل مشاهده است. رنگ آمیزی  $\text{H\&E} \times 100$

**ریه:** ضایعات میکروسکوپی در برونش و بافت بینابینی ایجاد شده بود. ضایعات پایدار نبودند و ویژگی خاصی نداشتند. بین جدایه‌ها از نظر میزان و شدت ضایعات تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در ایزوله ۹۲ و ۹۶ پرخونی و احتقان کانونی در روزهای ۲ تا ۸ از جمله ترومبوزهای غیر عفونی مشاهده شد و در روز ۴ شدت ضایعات افزایش یافت و پرخونی

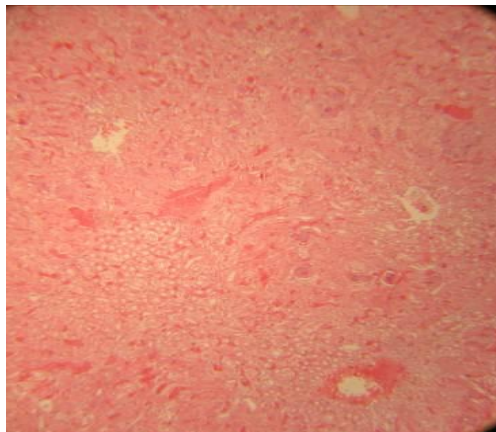
در نایژه‌ها در روز ۶ مشاهده شد. در ایزوله ۸۹، پرخونی و احتقان کانونی در روزهای ۲ تا ۴ شدیدتر و شامل ترومبوزهای غیر عفونی در روز ۶ و هیپرپلازی اپیتلیال در روز ۸ قابل مشاهده بود. در همه ایزوله‌ها، ضایعات دارای یک روند ثابت و کاهشی در روزهای ۱۰ و ۱۲ بودند (شکل ۲).



شکل ۲- ریه: ۴ dpi، احتقان در برونش‌ها، احتقان کانونی و ترومبوز غیر عفونی قابل مشاهده است. رنگ آمیزی  $\text{H\&E} \times 100$

انفیلتراسیون تک‌هسته‌ای متوسط و کانون‌های پراکنده ادم، خونریزی و پرخونی به طور متوسط قابل مشاهده بود. دژنراسیون متوسط تا شدید توبول‌ها و ادم اطراف گلومرول‌ها و بین لوله‌ها در روز ۶ مشاهده شد. از روز ۸ تا ۱۲، ارتشاح تک‌هسته‌ای متوسط و نکروز لوله‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۳).

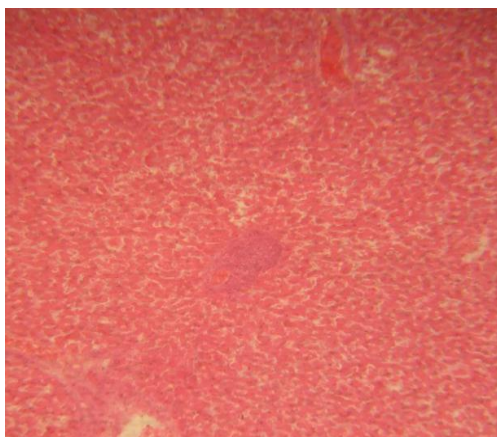
**کلیه:** ضایعات کلیه از روز ۴ پس از تلقیح در تمام ایزوله‌های مورد مطالعه، از جمله درگیری لوله‌ای و پارانشیمی رخ داد. از روز دوم، نفوذ خفیف سلول‌های تک‌هسته‌ای، کانون‌های پراکنده احتقان و پرخونی مشاهده شد. در روز چهارم از دست رفتن برخی گلومرول‌ها،



شکل ۳- کلیه: dpi ۴، فقدان مقداری گلومرول، انفیلتراسیون تک‌هسته‌ای متوسط و کانون‌های پراکنده ادم، خونریزی و پرخونی متوسط قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E  $\times 100$

شد. در روز ۸، دژنراسیون و نکروز اضافه شد. این روند در روزهای ۱۰ و ۱۲ با شیب نزولی ادامه یافت (شکل ۴).

**کبد:** ارتشاح لنفوسیتی و ادم در روز دوم مشاهده شد. ادم، نکروز، پرخونی و خونریزی در روز ۴، ارتشاح لنفوسیتی با کمی شدت بیشتر و ادم و کانون‌های پرخونی و خونریزی در روز ۶ مشاهده

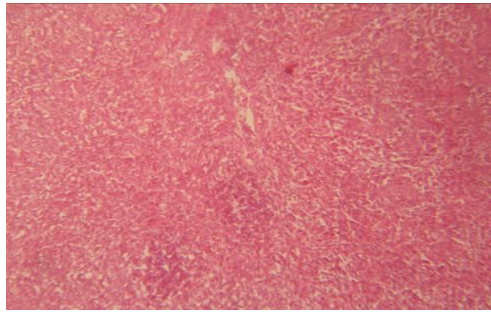


شکل ۴- کبد: dpi ۸، احتقان کانونی و ترومبوزهای غیر عفونی قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E  $\times 100$



خونی و احتقان خفیف در روز دوم مشاهده شد. در روز چهارم، تخلیه نسبی فولیکول های لنفاوی مشاهده شد. در روز هشتم پس از تلقیح، شدت ضایعات یکسان بود و همچنان رو به کاهش بود (شکل ۵).

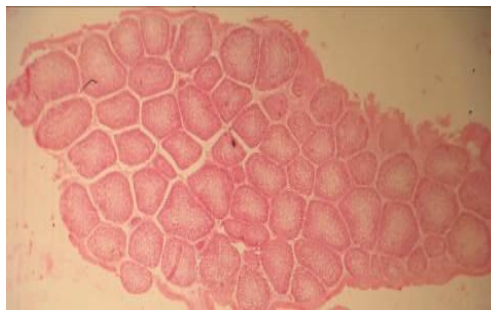
**طحال:** گروه ۹۶ پرخونی خفیف و کاهش جزئی در پالپ قرمز در روزهای دوم و چهارم نشان دادند. در روز ۶، ادم نسبی کاهش فولیکول های لنفاوی ادامه داشت. در روزهای دهم و دوازدهم به سمت بهبودی پیش رفت. در ۹۲ و ۸۹ جدایه، مشاهده پر



شکل ۵- طحال: dpi ۴، تخلیه نسبی فولیکول های لنفاوی، نواحی ادما تیک و پرخونی در سینوسوئیدها دیده می شود. رنگ آمیزی H&E × 400

روز ۴ که این تخریب فولیکول در روزهای ۶ و ۸، با شدت کمتر ادامه یافت (شکل ۶).

**بورس فابریسیوس:** یافته ها در هر سه جدایه تا حدودی مشابه بود و شامل: تخلیه نسبی سلول های لنفاوی در فولیکول ها در روز ۲ و ادامه تا حدی در



شکل ۶- بورس فابریسیوس: dpi ۴، تخلیه نسبی سلول های لنفاوی در فولیکول ها قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E × 40

پرزه ها در روز ۶، هیپرپلازی اپیتلیال در روز ۸، و در روزهای ۱۰ و ۱۲ روند بهبودی داشت (شکل ۷).

**لوزه های سکومی:** یافته ها شامل ادم زیر مخاطی و دژنراسیون پرزه ها در روز ۲ و ۴، جدا شدن

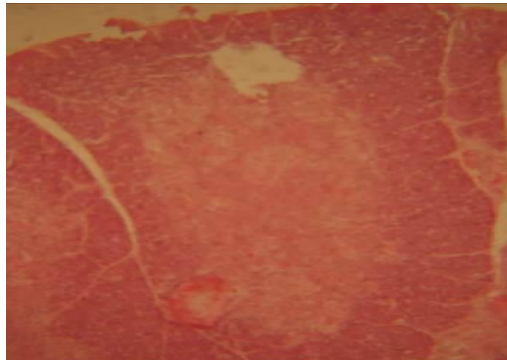


شکل ۷- لوزه های سکومی: هیپرپلازی اپیتلیال ۴ روز پس از تلقیح قابل مشاهده است. رنگ آمیزی H&E × 40



تیموس: کاهش متوسط فولیکولی و ادم کورتکس در روز دوم مشاهده شد. ادم، پرخونی و

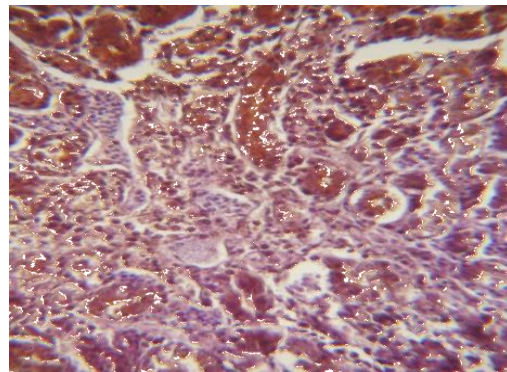
تخلیه نسبی در روزهای ۴، ۶ و ۸ مشاهده شد که تا پایان مطالعه با روند کاهشی ادامه یافت. (شکل ۸).



شکل ۸- تیموس: ۴ dpi، ادم، پرخونی، تخلیه نسبی در قشر همراه با نکروز دیده می‌شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین  $\times 100$

ایمونوهیستوشیمی: وجود آنتی‌ژن نوکلوکپسید ویروس آنفلوآنزای تیپ A توسط مشاهده رنگ قهوه‌ای در بافت ریه، سلول‌های

اپی‌تلیال گلومرولی بافت کلیه و روده در روزهای ۴ و ۶ پس از تلقیح تأیید شد. (شکل ۹).



شکل ۹- کلیه: ۴ dpi، رنگ قهوه‌ای نشان‌دهنده آنتی‌ژن‌های نوکلئوپروتئین در سلول‌های اپیتلیال لوله‌های کلیه است. رنگ آمیزی IHC  $\times 400$

## بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌زایی سه جدایه مشابه اما کاملاً یکسان نبود و در شروع علائم بالینی و هیستوپاتولوژیک و دفع ویروس بین جدایه‌های مورد مطالعه تفاوت جزئی وجود داشت، اما این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود.

تورم سر، ورم ملتحمه، افسردگی، ترشحات چشمی، کاهش مصرف غذا و آب، سرفه، عطسه و سینوزیت اطراف چشم در عفونت‌های H9N2 در

جوجه‌های گوشتی گزارش شده است (۱۰). در دو گروه از سه گروه آزمایشی علائم افسردگی و چرت زدن دیده شد. در مورد کالبدگشایی، در ۴ روز پس از تلقیح، التهاب خفیف در ریه و پرخونی در پانکراس مشاهده شد.

در یک مطالعه، سیانوز در تاج و ریش در روز ۳ پس از تلقیح مشاهده شد. پرخونی در روده کوچک و تورم کلیه در روز ششم پس از تلقیح بیشترین

علائم کالبدگشایی بود (۱۱). گزارش شده است که تحت تیپ H9N2 تنها در دستگاه تنفسی تکثیر می‌شود (۱۲). با این وجود شناسایی ویروس در طحال، نای، ریه، تیموس، بورس فابریسیوس و لوزه‌های سکوم تا ۵ روز و از سواب‌های کلوآکال تا ۷-۵ روز پس از تلقیح هم دیده شده است (۱۳-۱۵) محققان عقیده دارند که منبع ویروس در مدفوع به دلیل تکثیر ویروس در کلیه‌ها است (۱۶)، هر چند برخلاف این ادعا گزارشی است که ویروس H9N2 قبل از جداسازی از کلیه‌ها از روز ۳ تا ۹ پس از تلقیح در مدفوع هم شناسایی شده بود (۱۰، ۱۷).

با استفاده از واکنش RT-PCR Real-time ژن H9 در سواب‌های اوروفارنژیال از ۶-۲ روز پس از تلقیح، در حالی که ۴-۸ روز از سواب‌های کلوآکال شناسایی شد. طحال و لوزه‌های سکومی مانند سایر مطالعات تا ۸ روز دارای ویروس بودند (۱۱، ۱۷). ژن H9 در کبد و تیموس در مطالعه ما شناسایی نشد. نشان داده شد که ویروس‌های LPAI مانند H9N2 نمی‌توانند باعث ایجاد ویرمیما شوند، بنابراین فقدان ویروس H9N2 در بافت کبد، که قبلاً نشان داده شده بود منطقی به نظر می‌رسد (۱۰، ۱۱). با در نظر گرفتن مسیرهای ورود ویروس، سن گله، نوع نمونه، وضعیت ایمنی و نژاد جوجه‌های آلوده، مدت زمان جداسازی ویروس یا شناسایی ژنوم ویروسی از بافت‌ها یا سواب‌های مختلف ممکن است متفاوت باشد (۱۵).

در سنجش IHC، حضور آنتی‌ژن‌های نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا (NP) نوع A در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های اپیتلیال بافت‌های ریه، کلیه و روده در روزهای ۴ و ۶ پس از تلقیح نشان داده شد. حضور آنتی‌ژن ویروسی H9N2 در ۲ و ۴ روز پس از عفونت از نای، ریه و سیتوپلاسم اپیتلیوم لوله‌های کلیوی نکروزه گزارش شده است (۱۱). تشخیص طولانی مدت آنتی‌ژن

نوکلئوپروتئین AI در نای و ریه از ۲ تا ۱۱ و کلیه‌ها از ۶ تا ۱۱ روز پس از عفونت H9N2 توسط هادی پور مشاهده شد (۱۸).

در بررسی‌های میکروسکوپ نوری، بیشتر ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک در نای و ریه‌ها به‌ویژه بین روزهای ۲ تا ۸ پس از تلقیح مشاهده شد. ضایعات ریوی به صورت پرخونی در برونش‌ها و خونریزی کانونی در بافت پارانشیم در روزهای ۲ تا ۸ از جمله ترومبوز غیر عفونی مشاهده شد. در سن ۲۰ روزگی در جوجه‌های ROSS، نای التهاب حاد همراه با ادم، پرخونی، دژنراسیون غدد مخاطی و ارتشاح هتروفیل دو روز پس از تلقیح مشاهده شد، سپس التهاب لنفوسیتی نای و ریه همراه با انفیلتراسیون لنفوسیتی مشاهده شد. هیپرپلازی اپیتلیال تا ۱۱ روز پس از تلقیح ویروس مشاهده شد (۱۸، ۱۹). پس از عفونت تجربی با ویروس‌های LPAI مانند H7N1، H7N2، H10N4، دپرسیون تنفسی و کنده شدن اپیتلیوم در روزهای ۲ تا ۸ پس از عفونت مشاهده شد، هیپرپلازی اپیتلیال ریه هم از روز ۶ مشاهده شد (۱۵).

در مطالعه حاضر تغییرات هیستوپاتولوژی در کلیه از روز ۲ تا ۸ پس از تلقیح مشاهده شد (۱۵، ۱۶، ۲۰). بر عکس، در مطالعه‌ای بر روی ویروس‌های H4N8 و H5N1 کم بیماری‌زا، مشخص شد که نکروزه در اپیتلیوم توبولار رخ نمی‌دهد، و لذا پیشنهاد شد که این ویروس‌ها ممکن است در کلیه طیور تکثیر نشوند (۱۴). به دلیل عدم شناسایی ویروس در بافت تیموس، تغییرات هیستوپاتولوژیک در بورس و تیموس ممکن است به دلیل پاسخ ایمنی میزبان (لنفوسیت‌های B و T) برای حذف آنتی‌ژن خارجی باشد (۱۵، ۲۱). مشاهدات ما در بافت‌های طحال شامل پرخونی خفیف، کاهش جزئی در پالپ قرمز، هیپرپلازی سلول‌های

در مطالعه حاضر بیماری‌زایی و تروپیسم بافتی ۳ ویروس H9N2 جدا شده در سال‌های مختلف از مرغداری‌های ایران را در جوجه‌های بدون پاتوژن خاص مدل‌سازی کردیم تا بررسی کنیم که آیا بیماری‌زایی متفاوتی دارند؟ در مطالعات تجربی متعدد که سعی در بازتولید تظاهرات بالینی ویروس در سطح مرغداری‌ها داشته‌اند، مرگ و میر و علائم تنفسی به ندرت مشاهده شده مگر این که با عفونت ثانویه ویروسی یا باکتریایی همراه شود. در تحقیق حاضر هم هیچ گونه تلفاتی در گروه‌های تجربی دیده نشد و ضایعات تنها محدود به دستگاه تنفس و گوارش بود احتمالاً علت ضایعات هیستوپاتولوژیک در بافت‌هایی مانند تیموس که ویروس در آن شناسایی نشده بود واکنش‌های التهابی/ایمونولوژیک میزبان باشد. دوره تشخیص و دفع ویروس بین ۲ تا ۸ روز پس از تلقیح بود که نشان‌دهنده زمان محدود و کوتاه برای دفع ویروس و پاک‌سازی ویروس از بافت‌ها بود. با توجه به گزارشات موجود در سال‌ها و یا از کشورهای مختلف به نظر می‌رسد ویروس‌های H9N2 علی‌رغم قرار گرفتن در دسته ویروس‌های آنفلوآنزا با بیماری‌زایی کم اما تظاهرات متفاوتی در مرغداری‌ها از نظر شدت بیماری و بروز علائم بالینی از خود نشان می‌دهند که بسته به سویه ویروس، سن گله، شرایط ایمنی و مسائل مدیریتی می‌تواند متغیر باشد هر چند که در نهایت تروپیسم این ویروس به دستگاه تنفسی و دستگاه گوارش محدود می‌شود.

#### سپاسگزاری

نویسندگان مفتخرند از تمامی پرسنل بخش تشخیص بیماری طیور به خاطر کمک صمیمانه آنها در این تحقیق قدردانی کنند.

رتیکولواندوتلیال مشابه مطالعات دیگران بود (۱۸)، (۱۹). به نظر می‌رسد که اصطلاح بیماری‌زایی کم به تنهایی برای توصیف بیماری‌زایی ویروس H9N2 کافی نباشد، زیرا به نظر می‌رسد که تظاهر بالینی ایزوله‌های مختلف ویروس می‌تواند بسیار متفاوت باشد، اگرچه عواملی مانند مدیریت، عفونت‌های همزمان باکتریایی و ویروسی یا سرکوب‌کننده سیستم ایمنی. عوامل، سن، وضعیت ایمنی، سویه ویروس و نژاد مرغ می‌توانند از دلایل اصلی تفاوت‌های بیماری‌زایی در ایزوله‌های H9N2 باشند (۱، ۳، ۴، ۲۲). عفونت همزمان در شرایط مزرعه می‌تواند باعث تشدید بیماری و تظاهرات بسیار متفاوت از گزارشات تجربی شود. لذا در تفسیر نتایج و تعمیم آن به شرایط پرورش تجاری توجه به این نکته که آزمایش حاضر در شرایط کاملاً کنترل شده و در جوجه‌های SPF صورت گرفته و ممکن است همین جدایه‌ها در شرایط فیلدی به دلیل حضور عوامل پاتوژن ثانویه یا بیماری‌های سرکوبگر سیستم ایمنی با عوارض شدید و خسارات اقتصادی مشخص همراه باشند ضروری است. چنانچه که ویروس‌های مورد مطالعه همه از درگیری و طغیان‌های مشخص بالینی گله‌های تجاری جدا شده بودند. در خصوص تروپیسم این سه جدایه هر سه به بافت‌های گوارشی و تنفسی محدود بود که شاخصه بالینی ویروس‌های کم بیماری‌زا می‌باشد. تروپیسم غیر معمول برای ویروس‌های H9N2 توسط Bonfante و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است که یک ویروس H9N2 از دودمان G1 دارای تروپیسم برای اویداکت در مرغان تخم‌گذار بود. اگرچه شواهد آزمایشگاهی به وضوح توانایی ویروس‌های H9N2 را برای القای پاتولوژی در سطح مجرای تخمک نشان می‌دهد، تنها داده‌های کمی در مورد این نوع تروپیسم وجود دارد (۲۳).

## References

- 1- **Alexander DJ.** Report on Avian Influenza in the Eastern Hemisphere During 1997–2002. 2003;47 %. *J Avian Diseases*(s3): 792-7, 6.
- 2- **Kandeil A, Gomaa MR, Shehata MM, El Taweel AN, Mahmoud SH, Bagato O, et al.** Isolation and Characterization of a Distinct Influenza A Virus from Egyptian Bats. *Journal of virology.* 2019; 93(2): e01059-18.
- 3- **Capua I, Alexander DJ.** Avian influenza: recent developments. *Avian Pathology.* 2004; 33(4): 393-404.
- 4- **Guo YJ, Krauss S, Senne DA, Mo IP, Lo KS, Xiong XP, et al.** Characterization of the Pathogenicity of Members of the Newly Established H9N2 Influenza Virus Lineages in Asia. *Virology.* 2000; 267(2): 279-88.
- 5- **Kim JA, Cho SH, Kim HS, Seo SH.** H9N2 influenza viruses isolated from poultry in Korean live bird markets continuously evolve and cause the severe clinical signs in layers. *Veterinary microbiology.* 2006; 118(3): 169-76.
- 6- **Naeem K, Ullah A, Manvell RJ, Alexander DJ.** Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. 1999; 145(19): 560-.
- 7- **Nili H, Asasi K.** Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathology.* 2002; 31(3): 247-52.
- 8- **Gharaibeh S.** Pathogenicity of an Avian Influenza Virus Serotype H9N2 in Chickens. 2008;52 %. *Avian Diseases*(1): 106-10, 5. [In Persian]
- 9- **Mirzaei SeyedGholamreza SH, Nouri Abbas.** Development and Evaluation of Real-Time RT-PCR Test for Quantitative and Qualitative Recognition of Current H9N2 Subtype Avian Influenza Viruses in Iran. *Archive of Razi Institute.* 2018; 73(3): 177-82. [In Persian]
- 10- **Mosleh N, Dadras H, Mohammadi A.** Evaluation of H9N2 avian influenza virus dissemination in various organs of experimentally infected broiler chickens using RT-PCR %. *Iranian Journal of Veterinary Research.* 2009; 10(1): 12-20. [In Persian]
- 11- **Riel Dv, Munster VJ, Wit Ed, Rimmelzwaan GF, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, et al.** H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. 2006; 312(5772): 399.
- 12- **Bano S, Naeem K, Malik S.** Evaluation of Pathogenic Potential of Avian Influenza Virus Serotype H9N2 in Chickens. *Avian diseases.* 2003; 47: 817-22.
- 13- **Kwon J-S, Lee H-J, Lee D-H, Lee Y-J, Mo I-P, Nahm S-S, et al.** Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. *Virus Research.* 2008; 133(2): 187-94.
- 14- **Slemons RD, Swayne DE.** Nephrotropic Properties Demonstrated by A/Chicken/Alabama/75 (H4N8) Following Intravenous Challenge of Chickens. *Avian Diseases.* 1992; 36(4): 926-31.
- 15- **Swayne DE, Radin MJ, Hoepf TM, 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 Diseases.* 1994; 38(1): 151-7.
- 16- **Slemons RD, Swayne DE.** Replication of a Waterfowl-Origin Influenza Virus in the Kidney and Intestine of Chickens. *Avian Diseases.* 1990; 34(2): 277-84.
- 17- **Manjili S, Haghdoost I, Mortazavi P, Habibi H, Lashini H, Saberfar E.** Detection of H9N2 avian influenza virus in various organs of experimentally infected chickens. *African journal of microbiology research.* 2011; 5. [In Persian]
- 18- **Hadipour M.** Seroprevalence Survey of H9N2 Avian Influenza Virus in Backyard Chickens around the Caspian Sea in Iran. *Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular - REV BRAS CIR CARDIOVASC.* 2010; 12.
- 19- **Pazani J, Vasfi Marandi M, Ashrafihelan J, Marjanmehr S, Farid G.** Pathological Studies of A / Chicken / Tehran / ZMT - 173/99 (H9N2) Influenza Virus in Commercial Broiler Chickens of Iran. *International Journal of Poultry Science.* 2008; 7. [In Persian]
- 20- **Banani M MR, Pourbakhsh SA.** Simultaneous isolation of Ornithobacterium rhinotracheal and avian influenza virus subtype H9N2 from commercial poultry. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2002; 3(2): 190-5. [In Persian]
- 21- **Swayne DE, Slemons RD.** Comparative Pathology of a Chicken-origin and Two Duck-origin Influenza Virus Isolates in Chickens: The Effect of Route of Inoculation. *Veterinary Pathology.* 1994; 31(2): 237-45.
- 22- **Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N, Webster RG.** Characterization of avian H9N2

influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. *Virology*. 2007; 361(1): 45-55.

23- Bonfante F, Mazzetto E, Zanardello C, Fortin A, Gobbo F, Maniero S, *et al.* A G1-

lineage H9N2 virus with oviduct tropism causes chronic pathological changes in the infundibulum and a long-lasting drop in egg production. *Veterinary Research*. 2018; 49(1): 83.

## Assessment of parthenogenesis and tissue tropism of three H9N2 avian influenza virus isolates after experimental infection in Specific-Pathogen-Free chickens

Mohammad Eslampanah<sup>1</sup>, Najmeh Motamed<sup>2\*</sup>, Hamid Shoushtari<sup>3</sup>

1- Pathology department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and extension organization, Karaj, Iran.

2- Poultry vaccines research and production department , Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and extension organization, Karaj, Iran.

3- Poultry diseases research and diagnostic department , Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and extension organization, Karaj, Iran.

Receive: April 26, 2022; Revise: May 24, 2022; Accept: May 26, 2022

### Summary

Avian Influenza Virus (AIV) subtype H9N2 is one of the most important AIV in poultry around the world. An experiment was carried out for studying the pathogenicity of three H9N2 isolates. Eighty four one-day-old SPF chickens were divided randomly into “four groups (21 chicks per group)” in separate isolators with positive Air pressure. At the age of 30 days-old chickens in group 1, 2, and 3 were inoculated with 106EID<sub>50</sub> of three H9N2 isolates by oculo-nasal route, 4th group was kept as control and inoculated with mock allantoic fluid. Samples including oropharyngeal and cloacal swabs and various tissues were collected at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days post-inoculation (PI). The Real-time PCR assay was used for detection of the virus swab and tissue samples. In experiment groups, H9N2 AIV was detected from all examined tissues in 2, 4 and 6 dpi, exception was liver and thymus. Maximum histopathological lesions were seen from 2 till 8 dpi in trachea, lung, liver, kidney, spleen, cecal tonsil and thymus eventually. Lesions in other tissues including cecal tonsils, and cloaca was not significant. In immunohistochemical investigation, the presence of antigen in the epithelial cells of lung, kidney and intestinal tissues was observed on 4 and 6 days post inoculation. H9N2 viruses are of low pathogenicity but they show various clinical signs in commercial flocks. The results of this study showed some pathogenic differences among three isolates but the differences were not significant.

**Key words:** Avian influenza virus, H9N2 subtypes, Immunohistochemistry, Real time RT-PCR, SPF chicken