AF ۳۱۱

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۸، پاییز ۱۳۷۹

بررسی بیماریزایی ویروس آنفلوانزای طیور (تحت تیپ H9N2) جداشده از واگیری آنفلوانزا از یک مرغداری گوشتی در استان تهران در سال ۱۳۷۸

● مسعود مقدم‌پور ● ابراهیم بربند ● بهمن خالصی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی، بخش تحقیق و تولید واکسن‌های طیور

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۷۸ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۷۹

چکیده

کارشناسان بیماریهای طیور در مورد پاتوژنیسیته ویروس آنفلوانزای طیور (سویه H_9 N_2)) شایع در مرغداریهای آلوده ایران نظریات متفاوتی دارند. در این تجربه جهت تعیین و ارزیابی پاتوژنیسیته ویروس مذکور در سه بافت حیاتی جوجه‌های حاصل از تخم مرغهای SPF[1] همچون مغز، عضله سینه و ریه به طور مستقیم تلقیح شد و سه اندیس پاتوژنیسیته (ICPI[2]، IMPI[3] و IPPI[4]) محاسبه گردید. در طی زمان بیش از دو هفته گروهها از لحاظ علائم بیماری و مرگ تحت نظر قرار گرفته و اطلاعات مربوطه در جداول ثبت شد. براساس نتایج متخذه در گروه جوجه‌های IPPI, ICPI علائمی همچون کسالت، عدم تعادل، به هم چسبیدن پرها، پیچش گردن، ستاره نگری، تورم چشم و در پی آن مرگ و میر مشاهده شد. در گروه جوجه‌های IMPI بیماری بسیار خفیف در تعداد اندکی مشاهده شده ولی تلفاتی وجود نداشت. به‌طور کلی می‌توان اینگونه بیان کرد که نتایج حاصله در شرایط کاملاً کنترل شده به‌دست آمده است و به علت حضور فاکتورهای مداخله کننده در سطح گله این نتایج فیلد نمی‌تواند بیانگر وضعیت بیماری در مزارع مرغداری باشد.

کلمات کلیدی: بیماریزایی، بیماری طیور، بیماری آنفلوانزای طیور، ویروس آنفلوانزای سویه H9N2.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 48 PP: 120-122

A survey on AI virus (H9N2) pathogenicity isolated from an influenza infected broiler flock in Tehran Province on year 2000.

By: M. Moghaddampour, Barband E. & Khalesi B., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Dept. of Poultry Vaccines Research & Production.

Relevant experts in I.R. Iran have presented different ideas about the pathogenicity of Avian Influenza virus (AI) (H_9 N_2) infected flocks in different parts of the country. This experiment was carried out to determine the pathogenicity of the H_9 N_2 subtype strain isolated from broiler chicken. Different dilutions of AI virus were inoculated in the three vital organes like cerebral, pulmonary and muscle. and then pathogenicity index were calculated. Clinical signs and mortality rate of groups were recorded during two weeks observation in tables in ICPI and IPPI groups clinical signs such as decreased activity, ataxia, ruffled feathers, nervous disorder, star gazing, torticollis, conjuctivitis in eyes and death were observed in IMPI chicken group showed only a limited subclinical signs without any mortality. Overall it is concluded that results were got in standard situation and the occurrence of high mortality and severe lesions in the infected flocks showed that some other infecting agents have interfered as co - factors.

Key words: Pathogenicity, Poultry disease, Avian Influenza (AI), Influnza virus (H9N2).

مقدمه

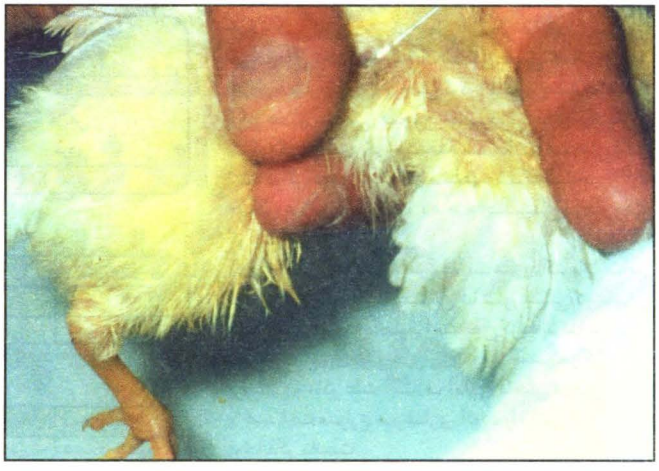
بیماری آنفلوانزای طیور به وسیله تیپ A ویروس آنفلوانزا متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده ایجاد می‌شود. علائم و میزان مرگ و میر به نوع ویروس، نژاد پرنده، وجود استرس و حضور یا عدم حضور آلودگی‌های دیگر بستگی دارد.

در دنیا انواع مختلفی از تیپ A آنفلوانزا از پرندگانی که حتی به ظاهر سالم به نظر می‌رسیده‌اند جدا شده است. که براساس ۱۴ یا ۱۵ نوع تحت تیپ آنتی‌ژنتیکی هماگلوتینین (HA) طبقه‌بندی شده‌اند. برای مشخص شدن میزان ویرولانس ویروسهای جدا شده می‌بایستی آنها را در میزبان اصلی مورد آزمایش قرار داد. مکرراً نشان داده شده است تحت تیپ‌های یکسان مقادیر متفاوتی از ویرولانس را دارا می‌باشند لذا تاکنون ارتباط مستقیمی بین ویرولانس و تحت تیپ آنتی‌ژنتیکی مشخص نشده است. گفته می‌شود ویرولانس تنها فاکتور منطقی قابل اندازه‌گیری در ویروسهای آنفلوانزا می‌باشد (۳). Allan و همکاران ویرولانس تعداد زیادی از ویروسهای آنفلوانزا را بوسیله اندیس پاتوژنیسیته مشخص نموده‌اند و بیان کرده‌اند روش ICPI که در مورد تعیین ویرولانس ویروس نیوکاسل به کار می‌رود می‌تواند در تعیین ویرولانس ویروس آنفلوانزا به کار رود(۴) و در همین راستا Beard و Easterday و سایرین در تعیین ویرولانس ویروس آنفلوانزا از همین روش استفاده نموده‌اند (۶، ۵ و ۴). این مقاله تعیین ویرولانس ویروس آنفلوانزای جدا شده را به وسیله همین روش و همچنین دو روش تلقیح داخل ریوی و داخل عضلانی انجام داده و میزان اندیس پاتوژنیسیته را در این روش با یکدیگر مقایسه نموده است.

مواد و روشها

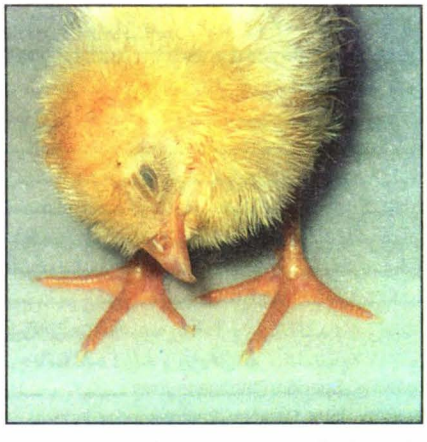
جوجه SPF

جوجه‌های حاصل از تخم مرغهای SPF که از شرکت لوهمن خریداری شده‌اند. آنها در شرایط پاک



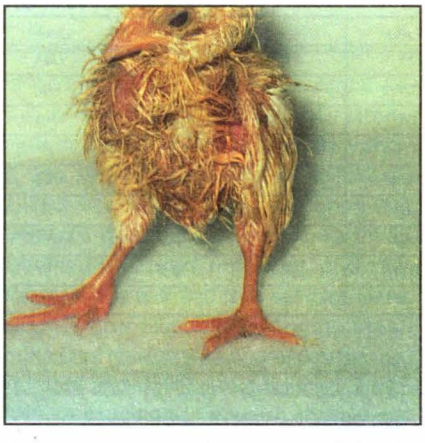
عکس شماره ۱- نحوه تلقیح داخل ریه سمت راست

عکس شماره ۵- دور هم جمع شدن و کز کردگی جوجه‌های مریض



عکس شماره ۲- علائم عصبی (پیچش گردن)

عکس شماره ۳- علائم عصبی (ستاره‌نگری) و تورم چشم



عکس شماره ۴- علائم ژولیدگی و به هم چسبیدن پرها در جوجه مریض

نگهداری شده و پس از تلقیح به همراه جوجه‌های SPF شاهد در محلی تمیز و پاک و دور از هر گونه آلودگی نگهداری می‌شدند.

ویروس آنفلوانزا

ویروس آنفلوانزای طیور سویه N_2 و H_9 (N_2 و H_9) (Chicken/Iran/101.1378) جدا شده از گله‌های آلوده منطقه کرج و قزوین می‌باشد که به تأیید آزمایشگاه بین‌المللی ویبریج انگلستان رسیده است.

تعیین اندیس پاتوژنیسیته تلقیح داخل مغزی (ICPI)

میزان ۰/۰۵ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ SPF تازه برداشت شده از طریق داخل مغزی به ۱۰ قطعه جوجه SPF یک روزه تلقیح شد. مایع رقیق کننده (PBS) استریل و فاقد هرگونه آنتی‌بیوتیک بوده است. به دوقطعه جوجه فقط از مایع رقیق کننده به همان روش داخل مغزی تلقیح صورت گرفت و به عنوان شاهد نگهداری شدند. قطر سوزن تلقیح ۰/۴۵ میلی‌متر و طول آن ۵ میلی‌متر بود. تزریق داخل مغزی در ناحیه پس سری انجام شده است. از جوجه‌ها هر روز در همان ساعت تلقیح تا ۱۲ روز بازدید به عمل آمد. جوجه‌ها به سه گروه سالم (بدون هیچگونه علائم بیماری) مریض (کز کرده، ژولیده، تورم چشم و سر - پارالزیس) و تلف شده تقسیم‌بندی می‌شدند (جدول شماره ۱) برای به دست آوردن اندیس مورد نظر جمع ردیف آخر پس از ارزشیابی به جمع ردیف اول قبل از ارزشیابی تقسیم می‌شود و عدد حاصل اندیس موردنظر خواهد بود. همین عملیات در تلقیح داخل ریوی و عضلانی انجام گرفته و جداولی به همین گونه طراحی شده است که به علت حجم زیاد از ارائه آن خودداری می‌شود علت ارزشیابی سالم، مریض و تلف شده محاسبات آماری بوده که در کتاب تولید واکسن نیوکاسل از انتشارات FAO به تفصیل آمده است.

تعیین اندیس پاتوژنیسیته از طریق تلقیح داخل ریوی (IPPI)

میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} مایع آلانتوئیک SPF تازه برداشت شده از طریق داخل ریوی از هر رقت به ۱۰ قطعه جوجه SPF یک هفته تلقیح شد. روش تهیه ویروس در بالا اشاره شده است. به دو قطعه جوجه فقط مایع رقیق کننده تلقیح شده و به عنوان شاهد نگهداری شدند. از جوجه‌ها هر روز در همان ساعت تلقیح تا ۱۵ روز بازدید به عمل آمد و آمارگیری طبق روش یاد شده در جداول مخصوص ثبت شد. معمولاً تلقیح از ناحیه سینه‌ای زیر بال سمت راست انجام می‌گرفت (عکس شماره ۱) جوجه‌های تلف شده در جریان تلقیح حذف شدند لذا بعضی گروه‌ها کمتر از ۱۰ قطعه جوجه بودند ولی از لحاظ کار آماری تعداد زنده پس از تلقیح ملاک عمل بوده است.

تعیین اندیس پاتوژنیسیته از طریق داخل عضلانی (IMP)

میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} و 10^{-2} مایع

جدول شماره ۱- تعداد جوجه‌های سالم، مریض و مرده در طول ۱۲ روز انجام مطالعه

جمع	ارزش	جمع	روز											وضعیت جوجه‌ها
			۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۰	۰	۷۱	۵	۵	۵	۵	۵	۴	۴	۴	۵	۹	۱۰	۱۰	سالم
۲۵	۱	۲۵	۱	۱	۱	۲	۲	۳	۴	۵	۵	۱	-	-	مریض
۴۸	۲	۲۴	۴	۴	۴	۳	۳	۳	۲	۱	-	-	-	-	مرده
۷۳		۱۲۰													جمع

جدول شماره ۲- نتایج اندیس ICPI

اندیس	مجدداً سالم شده ٪	مرده ٪	مریض ٪	سالم ٪	رقت ویروسی
۰/۶۱	۴/۲	۲۰	۲۰/۸	۵۹/۲	$۱۰^{-۱}$
صفر	صفر	صفر	صفر	۱۰۰	شاهد

جدول شماره ۳- نتایج اندیس IMPI

اندیس	مرده ٪	مریض ٪	سالم ٪	رقت ویروسی	گروه‌ها
٪۷۳	صفر	۱۰	۹۰	$۱۰^{-۱}$	۱
٪۷۳	صفر	۱۰	۹۰	$۱۰^{-۲}$	۲
-	-	-	۱۰۰	-	شاهد

جدول شماره ۴- نتایج اندیس IPPI

اندیس	مجدداً سالم شده٪	مرده ٪	مریض ٪	سالم ٪	رقت ویروسی	گروه‌ها
۰/۵۹	صفر	۲۳/۳	۱۲	۶۴/۷	$۱۰^{-۱}$	۱
۰/۵	صفر	۱۵/۹	۲/۲	۷۵/۶	$۱۰^{-۲}$	۲
۱/۱۵	صفر	۵۵/۸	۳/۳	۴۰/۸	$۱۰^{-۳}$	۳
۰/۴	۳	۱۶/۳	۴/۴	۷۹/۳	$۱۰^{-۴}$	۴
۰/۵۵	صفر	۲۰	۱۵/۲	۶۴/۸	$۱۰^{-۵}$	۵
۰/۴	صفر	۲۰	صفر	۸۰	$۱۰^{-۶}$	۶
۰/۶۹	صفر	صفر	۶۸/۶	۳۱/۴	$۱۰^{-۷}$	۷
۰/۲۷	۱۴/۳	صفر	۲۶/۷	۷۳/۳	$۱۰^{-۸}$	۸
-	-	-	-	۱۰۰	-	شاهد

آلانتوئیک تازه تهیه شده از تخم مرغ SPF تلقیح شده با ویروس AI برداشت و از طریق داخل عضلانی از هر رقت به ۱۰ قطعه جوجه SPF یک هفته تلقیح شد. روش تهیه ویروس قبلاً اشاره شده است. به دو قطعه جوجه فقط مایع رقیق کننده تلقیح شده و به عنوان شاهد نگهداری شدند. از جوجه‌ها تا ۱۵ روز در ساعت تلقیح بازدید به عمل آمد و آمارگیری طبق روش قبلی در جداول مخصوص ثبت شد. تلقیح در ناحیه عضله سینه انجام گردید.

نتایج

اندیس پاتوژنیسیته تلقیح مغزی (ICPI)

جوجه‌ها از روز دوم پس از تلقیح علائم بیماری را نمایان کردند. در روز سوم نیمی از جوجه‌ها مریض بودند که عمدتاً علائمی از به هم چسبیدن پرها، کز کردگی و تورم چشم و بعضاً علائم عصبی همچون عدم تعادل و ستاره نگری را نشان می‌دادند. (عکس شماره ۲ و ۳). تلفات از روز پنجم آغاز گردید و در روز هشتم یکی از جوجه‌های مریض مجدداً سلامتی را باز یافته و به جمع جوجه‌های سالم بازگشت و تا روز آخر از جمع جوجه‌های سالم کم نشده ولی به جمع جوجه‌های تلف شده اضافه شد. ستون جمع جوجه‌های سالم ۷۱، مریض ۲۵، و مرده ۲۴ بوده که پس از محاسبه ارزشیابی تعداد آنها به ترتیب صفر، ۲۵ و ۴۸ ثبت شد. جمع کل ستون اول قبل از ارزشیابی ۱۲۰ و جمع ستون آخر پس از ارزشیابی ۷۳ شد. اندیس ICPI در این نمونه برابر با ۰/۶۱ = $\frac{۷۳}{۱۲۰}$ بود. نتایج در جدول شماره ۲ آمده است.

اندیس پاتوژنیسیته تلقیح عضلانی (IMP)

تنها یک قطعه از جوجه‌های تلقیح شده در هر دو گروه در روز پنجم علائم بالینی را داشته و تا آخرین روز فقط همان دو قطعه جوجه علائم ژولیدگی و به هم چسبیدن پرها و دور هم جمع شدن را نشان دادند (عکس شماره ۴ و ۵). خوردن دان و آب به طور عادی انجام شده و علائم غیرعادی مشاهده نشد لذا اندیس برای دو گروه برابر ۰/۰۷۳ ثبت شد. درصد جوجه‌های سالم، مریض، مرده و اندیس‌ها در جدول ۳ آمده است.

بحث

خصوصیات بیولوژیک پاتوژنیسیته ویروس آنفلوانزا بسیار متغیر است و براساس میزبان یا نوع تحت تیپ ویروس نمی‌توان نوع و میزان ضایعات را پیش‌بینی کرد زیرا تغییرات آنتی‌ژنتیکی به تنهایی پاتوژنیسیته ویروس را مشخص نمی‌کند (۲).

همانطور که در Disease of Poultry آمده است حتی تهاجم ویروس آنفلوانزا به بافت‌های مختلف با تحت تیپ یکسان ممکن است ایجاد بیماری حادتری نماید (۱). لذا با نگاهی گذرا در نتایج مقایسه‌ای بین گروه اول و دوم تلقیح داخل عضلانی و ریوی که ویروس در عضله و دستگاه تنفسی محدود شده است، اختلاف بسیار چشمگیری مشاهده می‌شود. در مقایسه اعداد اندیس‌های حاصل از ICPI و IPPI با یکدیگر اختلاف خیلی کمی رویت می‌شود ولی از نظر علائم بالینی در جوجه‌های تحت تجربه ICPI علائم عصبی همچون عدم تعادل، ستاره نگری، پیچش گردن و تورم چشم به همراه سایر علائم عمومی همچون چسبیدن پرها به یکدیگر و کز کردگی و خمودگی مشاهده شد. علائم عمومی ذکر شده در گروه‌های دیگر هم مشاهده شد که البته در IMPI حداقل علائم یعنی فقط به هم چسبیدن پرها رویت گردید.

Toshiro و همکارانش عفونت‌های باکتریائی شایع در مرغداریها را به عنوان فاکتور اصلی در میزان بیماریزایی ویروس آنفلوانزا مشخص کرده‌اند لذا می‌توان با توجه به آلودگی‌های باکتریائی مستمر گله‌های پرورشی و مادر علت اختلاف آماری فاحش درصد تلفات و خسارات مزارع مرغداری آلوده را ناشی از فاکتور فوق‌الذکر دانست.

در انتها با توجه به اینکه این تحقیق در شرایط کنترل شده و با استفاده از جوجه‌های SPF انجام گردیده است، نتایج حاصله نشان دهنده تأیید استفاده از روش ICPI به عنوان یک روش خوب در ارزیابی پاتوژنیسیته ویروس آنفلوانزای طیور (۶، ۵، ۴ و ۳) به انضمام IPPI و IMPI می‌باشد ولی با توجه به فاکتورهای مداخله کننده در مزارع مرغداری نمی‌توان بین نتایج حاصله این تحقیق و آمار خسارات و تلفات مزرعه مقایسه نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از تمامی همکاران بخش کنترل، تشخیص بیماریهای طیور، تحقیق و تولید واکسنهای طیور و سازمان دامپزشکی که در این پژوهش به‌طور مستقیم و غیرمستقیم مشارکت داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

پاورقی‌ها

1- SPF= Specific Pathogene Free

2- ICPI= Intra Cerebral Pathogenecity Index

3- IMPI= Intra Mascular Pathogenecity Index

4- IPPI= Intra Pulmonary Pathogenecity Index

منابع مورد استفاده

1- Disease of poultry, 1991. (NINTH EDITION)

2- WHo memorandum bull, 1980. WHO 58: 583-591.

3- Allan W.H., Alexander D.J., Pomeroy B.S., Parsons G., 1977. Use of virulence index tests for avian influenza viruses. Avian dis 21, 359-363.

4- Beard C.W., Easterday B.C., 1973. A/Turkey/organ/71 An avirulent influenza isolate whit hemagglutinin of fowl plague virus Avian dis 17. 173-181.

5- Karunakara D., Halvorson D.A., Sivananda V., Newman J.A., 1988. Pathogenicity of Avian influenza viruses Isolated from wild mallard ducks and domestic turkeys, avian dis. 32: 319-323.

6- Ogawa T., Sugimura T., Itohara S., Tanaka Y., Kumagai T., 1980. Intracerebral pathogenicity of influenza A viruses for chickens. Archives of Virolgy 64, 383-386.