مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۳، ۳۴۴-۳۳۹
DOI: 10.22059/jvr.2017.127985.2322
Original Article

تأثیر بیماری بورس عفونی بر پاسخ جوجه بوقلمون به ویروس آنفلوانزای (H۹N۲) طیور

فرهادهاشم‌زاده[۴] منصورمیاحی[۱*] عبدالحمید شوشتری[۲] مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۳] مسعود قربانپور[۳]

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲) مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج، ایران
۳) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴) دانش آموخته بهداشت و بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ اسفند ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۲۹ اردیبهشت ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: عفونت با ویروس بیماری عفونی بورس (IBDV) ممکن است به سرکوب ایمنی در بوقلمون منجر شده و باعث گردد بوقلمون‌ها نتوانند دربرابر عوامل بیماریزا یا کم‌بیماریزا مقاومت نمایند. **هدف:** بررسی تأثیر IBDV بر پاسخ بوقلمون به ویروس آنفلوانزای پرندگان (AIV). **روش کار:** یک صد قطعه جوجه بوقلمون یک روزه تجاری هیبرید فرانسه به طور تصادفی به ۴ گروه مساوی ۲۵ قطعه‌ای تقسیم شدند. جوجه‌های گروه اول و دوم در سن یک روزگی ۱۰۴CID۵۰ از IBDV به روش خوراکی آلوده شدند. در ۳۰ روزگی جوجه‌های گروه‌های اول و سوم با ۱۰۶EID۵۰ از AIV (H۹N۲) به روش داخل بینی–چشمی آلوده شدند. جوجه‌های گروه چهارم به عنوان شاهد غیر آلوده نگه‌داری شدند. تمام گروه‌ها با واکسن بیماری نیوکاسل واکسینه شدند. **نتایج:** در روزهای ۳۰، ۳۷، ۴۴، ۵۱ و ۵۸ خون‌گیری و عیار پادتن ضد نیوکاسل و آنفلوانزا آن‌ها با آزمایش HI اندازه‌گیری شد. در روزهای ۳۳ و ۴۱ سه پرنده از هرگروه آسان‌کشی گردید و پاسخ تکثیر لنفوسیت‌های طحالی آن‌ها به فیتوهماگلوتینین ارزیابی شد. علایم آنفلوانزا در گروه ۱ شدیدتر و بادوام‌تر از گروه ۳ بود. میانگین عیار پادتن ضد NDV در تمامی زمان‌های نمونه‌گیری ولی عیار پادتن ضد AIV از روز ۱۴ بعد از عفونت در گروه ۱ به مراتب کمتر از گروه ۳ بود. پاسخ تکثیر لنفوسیت‌های طحالی به فیتوهماگلوتینین بین دو گروه ۱ و ۳ تفاوت معنی‌داری نداشت. **نتیجه‌گیری نهایی:** ویروس بیماری بورس عفونی می‌تواند باعث تضعیف پاسخ ایمنی در بوقلمون شده و علایم شدیدتر و بادوام‌تر آنفلوانزا را باعث شود.

واژه‌های کلیدی: بوقلمون، آنفلوانزای طیور، بیماری عفونی بورس، سرکوب ایمنی

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان از لحاظ بیماریزایی به بیماریزای کم و زیاد تقسیم بندی می‌شوند. ویروس‌های آنفلوانزا عمدتاً در دستگاه گوارش و تنفس تکثیر پیدا می‌کنند. ویروس‌های تحت تیپ H۹ به طور معمول جزء ویروس‌های با بیماریزایی کم بوده و باعث بیماری خفیف و یا متوسط می‌شوند (۱۶). ویروس‌های H۹N۲ در مناطقی مانند آسیای میانه، اروپا، آسیا و آفریقا از گونه‌های مختلفی مانند بوقلمون، ماکیان، بلدرچین، اردک و غاز جدا شده‌اند (۱،۲،۱۰). در پرندگان اهلی، بیماری آنفلوانزا، در بوقلمون بیشتر از سایر گونه‌ها دیده می‌شود (۱۹) و گزارش شده است بوقلمون نسبت به ماکیان به عفونت با ویروس‌های آنفلوانزای با بیماریزای کم مستعدترند، زیرا دوز عفونی‌زایی این ویروس برای بوقلمون به مراتب کمتر از ماکیان است (۱۷). عفونت‌های فصلی ناشی از ویروس‌های آنفلوانزای در بوقلمون اهلی، اردک و همچنین انسان با مهاجرت پرندگان آبزی در ارتباط است. ویروس آنفلوانزای H۹N۲ یکی از عوامل پنهانی تهدید آینده سلامت بشری محسوب شده است (۲،۱۶).

بیماری بورس عفونی یک بیماری حاد ویروسی خیلی عفونی‌زا ماکیان جوان است که هدف اصلی عامل، بورس فابرسیوس است (۱۶). سویه‌های خاص این ویروس می‌توانند در ماکیان با سن ۳ هفته و مسن‌تر تا ۶۰٪ تلفات را باعث شوند. عفونی شدن ماکیان باIBDV در روزهای اولیه‌ی پس از تولد، باعث سرکوب ایمنی شده و ماکیان را مستعد عفونت با سایر عوامل بیماریزا نظیر اشریشیا کلی کرده و عامل شکست واکسیناسیون محسوب می‌گردد (۱۶). ماکیان و بوقلمون جزء میزبان‌های طبیعیIBDV بوده ولی عفونت تجربی بوقلمون با IBDV، فقط تحت بالینی بوده است (۱۲). این ویروس بعد از ۵ بار پاساژ در بوقلمون باعث ضایعات میکروسکوپیک در بورس شده، آنتی‌ژنIBDV در بورس فابرسیوس بوقلمون‌ها قابل ردیابی و جداسازی بوده است (۷). با توجه گزارشاتی درخصوص سرکوب ایمنی بوقلمون متعاقب آلودگی تجربی (۳،۱۱) با IBDV این مطالعه با هدف بررسی تأثیر این ویروس بر عفونت تجربی جوجه بوقلمون با ویروس آنفلوانزای H۹N۲ صورت گرفت.

مواد و روش کار

آماده‌سازی ویروس‌ها (تکثیر ویروس آنفلونزای پرندگان تحت تیپ H۹N۲): به منظور تکثیر ویروس AIV از روش تأیید شده سازمان بهداشت جهانی استفاده شد (۱۸). بر این اساس ابتدا ویروس آنفلونزای پرندگان

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۰۰۷۳، نمابر: ۰۶۱-۳۳۳۶۰۸۰۷، Email: mansoormayahi@scu.ac.ir

تحت تیپ H۹N۲ (A/Chicken/Iran/AH-۰۶/۱) از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (ایران) تهیه و در حفره آلانتوئیک تخم مرغ جنین‌دار ۱۱-۹ روزه تلقیح شد، ۳-۲روز پس از انکوباسیون در دمای ۳۷°C تخم مرغ‌ها از انکوباتور خارج و به مدت یک شب در یخچال در دمای ۴ °C نگه‌داری شدند. مایع آلانتوئیک تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شده، جمع‌آوری و در فریزر نگه‌داری شد. در هنگام استفاده، EID۵۰ (دوز عفونی کننده‌ی ۵۰٪ تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ماکیان) این ویروس براساس فرمول رید و مانش (۱۴) تعیین شد و جهت القاء عفونت تجربی به هر جوجه بوقلمون میزان EID۵۰ 10^6از ویروس تلقیح گردید (۱۸).

تکثیر ویروس بیماری بورس عفونی: به منظور تکثیر ویروس بورس عفونی، ۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه خریداری و در محلی مجزا پرورش داده شدند. جوجه‌ها در تمام مدت دوره پرورش به آب و دان استریل به صورت آزاد دسترسی داشتند، در ۲۱ روزگی ۵ قطعه از جوجه‌ها با ml ۰/۱ از سوسپانسیون ۱۰٪ بورس فابریسیوس آلوده به سویه‌ی خفیفی از IBDV که از مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد، از راه داخل بورس آلوده شدند. سه روز پس از تلقیح تمام جوجه‌ها آسان‌کشی شده و بورس آن‌ها زیر هودلامینار و در کنار شعله برداشته شد. بورس‌های جمع‌آوری شده درهاون چینی استریل خرد شد و سوسپانسیون ۱۰٪ آن‌ها در محیط RPMI تهیه و با دور g ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به عنوان منبع ویروس، جدا شده در فریزر نگه‌داری شد و قبل از استفاده CID۵۰ آن با تلقیح به شکل داخل بورس به ۴۵ قطعه جوجه گوشتی درسن ۳۳ روزگی براساس روش رید و مانش (۱۴) تعیین گردید. جهت القاء عفونت تجربی به طریق دهانی به هر جوجه بوقلمون میزان CID۵۰ ۱۰۴ از ویروس تلقیح شد (۳).

طرح آزمایش: یک صد و بیست قطعه جوجه بوقلمون تجاری از نژاد هیبرید فرانسه یک روزه خریداری و در روز اول به منظور تعیین میزان عیار پادتن‌های اختصاصی ضد AIV، ضد IBDV، ضد NDV و زمان مناسب واکسیناسیون آن‌ها، از ۲۰ قطعه، خون‌گیری و عیار ضد AIV و ضد NDV سرم، با روش ممانعت از هماگلوتیناسیون و عیار ضد IBDV با روش الیزا (ID Vet، فرانسه) اندازه‌گیری شد.

یکصد قطعه جوجه‌ی باقی مانده به طور تصادفی به ۴ گروه مساوی ۲ قطعه‌ای تقسیم شدند. گروه اول و دوم، در سن یک روزگی به روش خوراکی با CID۵۰ ۱۰۴ از IBDV عفونی شدند (۳). جوجه‌های گروه‌های اول و سوم، در سن ۳۰ روزگی به روش داخل بینی-چشمی با EID۵۰ 10^6 ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H۹N۲ آلوده شدند (۱۸). جوجه‌های گروه چهارم به عنوان شاهد غیر آلوده به AIV و IBDV نگه‌داری شدند. جوجه بوقلمون‌های تمام گروه‌ها در سن ۱۰ روزگی با واکسن نیوکاسل زنده لاسوتا و کشته روغنی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی واکسینه شدند.

ارزیابی ایمنی سلولی: جهت ارزیابی ایمنی سلولی، پاسخ لنفوسیت‌های طحال به فیتوهماگلوتینین اندازه‌گیری شد. برای این کار از روش Nusbaum و همکاران در سال ۱۹۸۸ و نیز و Loa همکاران در سال ۲۰۰۱، با کمی تغییرات بهره‌گیری شد. برای این کار سه قطعه از جوجه بوقلمون‌های هر گروه، در روزهای ۳ و ۱۱ پس از آلودگی با AIV (در سنین ۳۳ و ۴۱) به طور تصادفی انتخاب و آسان‌کشی شد. در زیر هود لامینار با شرایط آسپسی طحال پرنده خارج و در پلیت استریل قرار داده شد. طحال در ۴ میلی‌لیتر محیط RPMI آنتی‌بیوتیک‌دار له شد و پس از ۵ دقیقه، سوسپانسیون سلولی رویی در دور g ۴۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و به ازای هر ml ۰/۱ سلول، ml ۱/۴ از محلول لیز کننده گلبول قرمز اضافه شد و مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. پس از آن دومرتبه سانتریفوژ تکرار و رسوب سلولی (لنفوسیت‌ها) دوبار باRPMI شستشو شد. لنفوسیت‌های طحالی جداسازی شده از نظر زنده بودن با تریپان بلو و لام هموسیتومتر بررسی و شمارش گردیدند. تعداد ۱۰۴ لنفوسیت از هر جوجه در چهار تکرار در حفرات پلیت کشت سلول حاوی محیط کشت RPMI منتقل شده و دو حفره از هر نمونه با فیتوهماگلوتینین ۲٪ (Sigma، آمریکا) مجاور و به دو حفره باقیمانده از هر نمونه به عنوان شاهد به جای فیتوهماگلوتینین بافر نمکی فسفات اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور CO_2 دار گرم‌خانه‌گذاری شدند و پس از آن میزان سلول‌های موجود در هر حفره با کیت تعیین تکثیر سلول به روش Roche) MTT، آلمان) ارزیابی و میزان تکثیر لنفوسیت‌ها (Stimulation Index) در پاسخ به ترکیب میتوززای فیتوهماگلوتینین مطابق فرمول زیر برآورد شد (۱۱).

درصد SI یا شاخص تحریک= (میانگین دو نمونه تحریک نشده/ میانگین دو نمونه‌ی تحریک شده) × ۱۰۰

ارزیابی ایمنی هومورال: در سن یک روزگی از بیست پرنده و در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ بعد از آلوده کردن با AIV (در سنین ۳۰، ۳۷، ۴۴، ۵۱ و ۵۸) از ۱۰ پرنده از هر گروه خون‌گیری و عیار پادتن ضد NDV و AIV سرم با HI (ممانعت از هماگلوتیناسیون) طبق روش توصیه شده‌ی توصیه‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO) اندازه‌گیری شد (۱۸).

روش آماری: آنالیز داده‌ها براساس نرم افزارSPSS نسخه۱۶ به روش آنلیز واریانس یک طرفه با آزمون تکمیلی LSD در سطح معنی‌دار$p>0/05$ صورت گرفت.

جدول ۱. میانگین درصد شاخص تحریک سلولی (Stimulation index٪) سلول‌های طحال بوقلمون. حروف متفاوت در هر ستون نشانه تفاوت معنی‌دار ($p<0/05$) بین میانگین‌ها است.

سن به روز/گروه	۳۳	۴۱
۱ (آلوده شده با IBD + AIV)	۴۲/۴ ± ۱۵/۳ [a]	۲۵/۲ ± ۷/۹ [a]
۲ (آلوده شده با IBD)	۴۷/۱ ± ۴/۸ [a]	۳۲/۲ ± ۱۳/۲ [a]
۳ (آلوده شده با AIV)	۳۶/۶ ± ۲ [a]	۴۳/۵ ± ۲۸ [a]
۴ (کنترل)	۲۴/۱ ± ۵/۸ [a]	۷۰/۱ ± ۸/۸ [b]

جدول ۲. میانگین عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا H۹N۲ در بوقلمون‌ها. حروف متفاوت در هر ستون نشانه تفاوت معنی‌دار (p< ۰/۰۵) بین میانگین‌تیترهااست (p<۰/۰۵).

سن به روز/گروه	۳۰	۳۷	۴۴	۵۱	۵۸
۱ (IBD + AIV)	۱/۳ ± ۰/۱۵ a	۳/۲ ± ۰/۲۱ a	۴/۷ ± ۰/۱۹ a	۴/۳۵ ± ۰/۱۵ a	۴/۲۵ ± ۰/۳ a
۲ (آلوده شده با IBD)	۱/۵ ± ۰/۱۷ a	۰/۹ ± ۰/۱۸ b	۱/۱ ± ۰/۱ b	۰/۸ ± ۰/۱۳ b	۰/۴ ± ۰/۱۸ b
۳ (آلوده شده با AIV)	۱/۴ ± ۰/۱۶ a	۳/۲ ± ۰/۱۱ a	۶/۹ ± ۰/۱۸ c	۶/۰۵ ± ۰/۱۹ c	۵/۷ ± ۰/۲۵ c
۴ (کنترل)	۱/۴ ± ۰/۱۶ a	۱/۳ ± ۰/۱۳ b	۱/۲ ± ۰/۱۳ b	۰/۷ ± ۰/۱۵ b	۰/۶ ± ۰/۱۶ b

جدول ۳. میانگین عیار پادتن ضد ویروس واکسن نیوکاسل در بوقلمون‌ها. حروف متفاوت در هر ستون نشانه تفاوت معنی‌دار (p < ۰/۰۵) بین میانگین‌ها است.

سن به روز/گروه	۳۰	۳۷	۴۴	۵۱	۵۸
۱ (آلوده شده با IBD و AIV)	۲/۲ ± ۰/۶۳ a	۳/۲ ± ۰/۵۷ a	۳/۸ ± ۰/۳۳ a	۵/۳ ± ۰/۳۷ a	۴/۲ ± ۰/۴۲ a
۲ (آلوده شده با IBD)	۱/۴۵ ± ۰/۳۴ a	۳/۶ ± ۰/۶۷ b	۳/۹ ±۰ /۲۸ a	۵/۴۵ ± ۰/۳۱ a	۴/۳ ± ۰/۳ a
۳ (آلوده شده با AIV)	۳/۰۵ ± ۰/۲۸ b	۴/۵ ± ۰/۲۲ c	۵/۶ ± ۰/۴۸ b	۷/۱ ± ۰/۴۱ b	۶/۵۵ ± ۰/۳۷ b
۴ (کنترل)	۴ ± ۰/۴۲ b	۵/۳ ± ۰/۳ d	۶/۸ ± ۰/۴۲ c	۷/۴۵ ± ۰/۳ b	۷/۳۵ ± ۰/۴۸ b

نتایج

نشـانه‌های درمانگاهـی متعاقـب چالـش بـا IBDV و AIV: در بوقلمون‌های گروه‌های ۱ و ۲ در خلال چندین روز بعد از تلقیح در سن یک روزگی با IBDV فقط مصرف آب افزایش یافت و جوجه بوقلمون‌های تمام گروه‌ها از لحاظ درمانگاهی طبیعی بودند.

یکـی دو روز بعد از چالش با ویروس آنفلوانـزا، پرندگان گروه‌های ۱ و ۳، نشـانه‌هایی مانند بی‌حالی، ژولیدگی پرها، مشکلات تنفسی (سرفه، عطسه و تنگی نفس)، تورم بافت‌های اطراف کره چشم، ترشحات بینی و چشم، تورم ملتحمه و اسهال سیاه رنگ خیلی بد بو مشاهده شد. نشانه‌ها در گروه ۱ شدیدتر و بادوام‌تر از گروه ۳ بود. هفت روز بعد از چالش نشانه‌های درمانگاهی کاهش پیدا کرد و تلفات در هیچ گروهی مشاهده نشد.

عیار اولیه پادتن ضد ویروس‌های گامبورو، نیوکاسـل و آنفلوانزا: سرم ۲۰ جوجـه بوقلمون در یک روزگی از نظر پادتن ضد IBDV با روش الیزا منفـی بود. میانگین و انحراف معیار عیار پادتن ضد ویروسNDV و AIV جوجه بوقلمون‌ها در یک روزگی به ترتیب ۰/۵ ± ۱/۵ و ۱/۳ ± ۳/۹۵ بود.

تأثیر IBD بر ایمنی سلولی بوقلمون: جدول ۱ میانگین شاخص تکثیر سـلول‌های طحالـی (stimulation index) بوقلمون‌هـای گروه‌های مختلف در ۳۳ و ۴۱ روزگی را نشـان می‌دهد. همانگونه که قابل مشـاهده است، شاخص فوق که بیانگر سطح ایمنی سلولی است، در سن ۳۳ روزگی یعنی ۳ روز پس از چالش باAIV تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف ندارد (p>۰/۰۵)، ولی در سـن ۴۱ روزگی در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به مراتب کمتر از گروه شاهد بوده است (p<۰/۰۵).

تأثیـر IBD بر ایمنـی هومورال نسـبت به ویروس‌های نیوکاسـل و آنفلوانزا: جدول ۲ و ۳ به ترتیب میانگین عیار پادتن ضد AIV و ضد NDV بوقلمون‌هـای گروه‌های مختلـف در روزهای مختلف را نشـان می‌دهند. میانگیـن عیار پادتن ضد ویـروس آنفلوانزا در گروه‌هـای ۱ و ۳ در تمامی زمان‌هـای خون‌گیری بجز روزهـای ۳۰ و ۳۷ (همزمان بـا اوایل عفونت تجربی) به مراتب بیشتر از دو گروه دیگر بوده است (p>۰/۰۵). نتایج نشان می‌دهـد که گروه‌هـای هدف با موفقیت آلوده شـده‌اند و ویروس بیماری بورس عفونی باعث کاهش معنی‌دار عیار پادتن درگروه ۱ نسبت به گروه ۳ در ۴۴، ۵۱ و ۵۸ روزگی شده است (p<۰/۰۵). سطح پایین پادتن ضد AIV گروه‌هـای ۲ و ۴ حکایت از عـدم وقوع آلودگی طبیعی یا انتقال آلودگی از گروه‌های ۱ و ۳ به این گروه‌ها است.

همانگونـه که در جدول ۳ مشـاهده می‌شـود، پادتن ضـد NDV در گروه‌های ۳ و ۴ در تمامی زمان‌های خونگیری به مراتب بیشتر از دو گروه دیگـر بوده اسـت (p<۰/۰۵) یعنی ویروس بیماری بـورس عفونی باعث کاهش معنی‌دار عیار پادتن درگروه‌ها ۱ و ۲ نسبت به گروه ۳ و ۴ را باعث شده است (p<۰/۰۵).

بحث

ویروس‌های آنفلوانزا با بیماریزایی‌کم مثل ویروس آنفلوانزای H۹N۲ باعث بیماری تنفسی و افت تولید تخم در بوقلمون می‌شوند، اما درشرایط موجـود در مزارع پرورش طیور شـامل مدیریت، بیماری‌هـای باکتریایی ویروسـی همزمان، عوامل سـرکوب‌گر ایمنی، گونه و سن طیور، تلفات و خسارات زیادی به بار می‌آورند و گزارش شده است که بوقلمون از این نظر مستعدتر از ماکیان است (۱۶). این مطالعه که با هدف بررسی تأثیر عفونت تجربی جوجه بوقلمون با IBDV بر پاسـخ ضد ویروس آنفلوانزای H۹N۲ صورت گرفت نشـان داد که تلقیح جدایه‌ای از IBDV با منشاء ماکیان به جوجه بوقلمون‌های یک روزه با علایم درمانگاهی خاصی همراه نیسـت. در توافق با یافته‌ی فوق Nusbaum و همکاران در سال ۱۹۸۸ در تلقیح جوجه بوقلمون‌های یکروزه با ویروس بورس عفونی جدا شـده از بوقلمون بیان داشته‌اند که عفونت با ویروس فوق یک بیماری نهفته‌ی بدون علایم درمانگاهـی اسـت. Giambrone و همکاران در سـال ۱۹۷۸ نیز اعلام نموده‌اند که تلقیح تجربی (قطره چشـمی) ویروس بیماری بورس عفونی

جدا شــده از ماکیان مبتلا به فرم درمانگاهی، به بوقلمون‌های ۳ تا ۶ هفته بــا عفونت تحت درمانگاهی همراه بوده و هیچ گونــه واگیری، تلفات و یا ضایعات ماکروسکوپی ندارد.

مطالعه حاضر نشان داد اگرچه آلودگی با ویروس گامبورو باعث تلفات ناشی از ویروس آنفلوانزای H۹N۲ نمی‌شود ولی باعث تشدید و دوام بیشتر علایم ناشــی از آن می‌گردد. بررسی‌ها نشــان داد گزارش منتشر شده‌ای در این خصوص در بوقلمون وجود ندارد ولی بررســی‌های مشابهی (۹،۱۳) در ماکیان صورت گرفته اســت که دال بر ســرکوب پاسخ نسبت به عوامل عفونی متعاقب آلودگی به IBDV است. در تأیید یافته‌ی فوق Nusbaum و همــکاران در ســال ۱۹۸۸ وChui و همــکاران در ســال ۱۹۸۴ اعلام نموده‌اند که آلودگی جوجه بوقلمون‌ها با IBD در یک روزگی با ســرکوب پاسخ ایمنی همراه است. Motamed و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تلقیح تجربی ویروس آنفلوانزا ســروتیپ H۹N۲ در جوجههای گوشتی آلوده به ویروس بورس عفونی نشان داده‌اند که آلودگی جوجههای گوشتی یکروزه به ویروس گامبورو منجر به افزایش زمان و شــدت دفع ویروس آنفلونزای پرندگان ســروتیپ H۹N۲ در اندام‌های مختلف شــده و تلفات را افزایش میدهد. Ramirez-Nieto و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز گزارش کرده‌اند که عفونت اولیه با IBDVماکیان را خیلی مستعد عفونت ویروس آنفلوانزا می‌کند.

در مطالعــه حاضر در بررســی تأثیر ویروس گامبورو بر ایمنی ســلولی (پاسخ تکثیری لنفوســیت‌های طحالی به PHA) مشاهده شد که شاخص تکثیر در سن ۳۳ روزگی یعنی ۳ روز پس از چالش با AIV تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف ندارد (p>۰/۰۵) ولی در سن ۴۱ روزگی در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به مراتب کمتر از گروه شــاهد اســت (p<۰/۰۵) که دال بر تأثیر منفی عفونت‌های ویروســی (عفونــت با IBD یا AIV) بر ایمنی ســلولی بوقلمون اســت ولی چون بیــن دو گروه ۲ و ۳ اختلاف معنــی‌داری وجود نداشــت (p>۰/۰۵)، نمی‌تــوان با قاطعیت نتیجه‌گیــری نمود که ویروس گامبورو باعث تضعیف ایمنی ســلولی می‌گردد. با توجه به بررسی منابع به نظر می‌رسد در خصوص تأثیر ویروس گامبورو بر ایمنی هومورال پرندگان شکی وجود نداشته باشــد ولی در مورد تأثیرش بر ایمنی سلولی گزارشات متناقضی وجود دارد که شــاید بخشــی از این تناقض‌ها بــه روش ارزیابی ایمنی سلولی، سویه ویروس گامبورو، سن پرنده در هنگام آلودگی تجربی و روش تلقیح مربوط باشد. در تناقض با این یافته از بررسی حاضر در جوجه بوقلمون‌های ۳ روزه تا ۴ هفته بعد از عفونت با ویروس بورس عفونی یک سرکوب چشمگیر پاسخ سلول T به میتوژن کونکاوالین A دیده شده است (۱۱). Chui و همکاران در ســال ۱۹۸۴، نیز در بررسی تأثیر تلقیح تجربی ویروس بورس عفونی در سنین مختلف و اثرات آن بر اجزاء سیستم ایمنی بوقلمون‌ها، گزارش نموده‌اند که ایمنی سلولی و هومورال جوجه بوقلمون‌ها فقط متعاقب عفونت در یک روزگی ســرکوب شده و این سرکوب بسته به ســویه ویروس، متفاوت است .در توافق با یافته‌ی ذکرشده مطالعه حاضر، Sharma و همکارن در سال ۱۹۸۳ و Confer و همکارن در سال ۱۹۸۱ نیز سرکوب گذرا در پاسخ بلاستوژنیک سلول‌های طحال و خون ماکیان به فیتوهماگلوتینین را گزارش نموده‌اند.

چنانکه در نتایج نیز اشــاره شــد، ویروس بورس عفونی باعث کاهش چشــمگیر و معنی‌دار عیار پادتن ضــد AIV و ضد NDV درگروه آلوده به IBDVنســبت به گــروه غیرآلوده به IBDV گردیده اســت. اگرچه به نظر می‌رســد در خصوص این یافته نیز گزارشــی در منابع موجود نیســت ولی مطالعه‌ی Nusbaum و همکاران در ســال ۱۹۸۸ مبنی کاهش ناگهانی شــدید در تعداد پلاسماســل‌ها متعاقب آلودگی به IBDV تأیید کننده این یافته اســت. Dohms و همکاران نیز در سال ۱۹۸۸، گزارش نموده‌اند که در ماکیان گوشــتی مبتلا به IBDV عیار پادتن ضد آنتی‌ژن‌های دریافتی (بروســلا آبورتوس و گلبول قرمز گوسفند) کاهش می‌یابد. Faragher و همکاران هم در ســال ۱۹۷۴ اعلام نموده‌اند که ســرکوب تولید پادتن ضد ویروس نیوکاســل در ماکیان گوشــتی آلوده به IBDV و واکسینه شده با واکسن نیوکاسل قابل توجه است.

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که ویروس بیماری بورس عفونی در بوقلمون‌هایی که در یک روزگی آلوده شوند می‌تواند به شکل معنی‌داری باعث تضعیف پاســخ ایمنی هومورال ضد نیوکاسل و ضد آنفلوانزا، تشدید علایم آلودگی به ویروس آنفلوانزا شــده H۹N۲ ولی در زمان‌های ارزیابی شده (۳۳ و ۴۱ روزگی) تأثیر قابل توجهی بر ایمنی سلولی ندارد.

تشکر و قدردانی

نویســندگان وظیفه خود می‌دانند از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم ســازی رازی کرج و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که پژوهش فوق را حمایت مالی نمودند، تشکر و قدردانی نمایند. از زحمات جناب دکتر مهدی پورمهدی بروجنی نیز که در تحلیل آماری نتایج کمک نمودند، صمیمانه تشکر می‌گردد.

References

1. Brown, I.H., Banks, J., Manvell, R.J., Essen, S.C., Shell, W., Stomka, M. (2006) Recent epidemiology and ecology of influenza A viruses in avian species in Europe and the Middle East. Dev Biol. (Basel). 124: 45-50.
2. Capua. I., Alexander, D.J. (2009) Avian influenza infection in birds: a challenge and opportunity for the poultry veterinarian. Poult Sci. 88: 842-
3. 846.
Chui, C., Thorsen, J. (1984) Experimental infection of turkeys with infectious bursal disease vi-

rus and the effect on the immunocompetence of
4. infected turkeys. Avian Dis. 28: 197-207.
Confer, A.W., Springer, W.T., Shane, S.M., Conovan. J.F. (1981) Sequential mitogen stimulation of peripheral blood lymphocytes from chickens inoculated with infectious bursal disease virus.
5. Am J Vet Res. 42: 2109-2113.
Dohms, J.E., Lee, K.P., Rosenberger, J.K. (1981) Plasma cell changes in the gland of Harder following infectious bursal disease virus infection
6. of the chicken. Avian Dis. 25: 683-695.
Faragher. J.T., Allan, W.H., Wyeth, C.J. (1974) Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease.
7. Vet Rec. 95: 385-388.
Giambrone, J.J., Fletcher, O.J., Lukert, P.D., Page, R.K., Eidson, C.E. (1978) Experimental infection of turkeys with infectious bursal dis-
8. ease virus. Avian Dis. 22: 451-458.
Loa, C. C., Lin, T. L., Wu, C. C., Bryan, T., Thacker, H. L., Hooper, T., Schrader, D. (2001) Humoral and cellular immune responses in turkey poults infected with turkey coronavirus.
9. Poult Sci. 80: 1416-1424.
Motamed, N., Mayahi, M., Seifi, M.R. (2013) Effect of infectious bursal disease virus on pathogenicity of avian influenza virus subtype H9N2 in broiler chicks. J Vet Med Anim Health.
10. 5: 276-280.
Nili, H., Asasi, K. (2002) Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian
11. Pathol. 31: 247-252.
Nusbaum, K.E., Lukert, P.D., Fletcher, O.J. (1988) Experimental infections of one-day-old poults with turkey isolates of infectious bursal
12. disease virus 1. Avian Pathol. 17: 51-62.
Oladele, O. A., Adene, D. F., Obi, T. U., Nottidge, H. O. (2009) Comparative susceptibility of chickens, turkeys and ducks to infectious bursal disease virus using immunohistochemistry. Vet
13. Res. Commun. 33: 111-121.
Ramirez-Nieto, G., Shivaprasad, H.L., Lillehoj, H.S., Perez, D.R. (2010) Adaptation of a Mallard H5N2 low pathogenicity influenza virus in chickens with prior history of infection with in-
14. fectious bursal disease virus. Avian Dis. 54: 513-521.
Reed, L.J., Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoint. Am J Hyg.
15. 27: 493-497.
Sharma, J.M., Lee, L.F. (1983) Effect of infectious bursal disease virus on natural killer cell activity and mitogenic response of chicken lymphoid cells: Role of adherent cells in cellular im-
16. mune suppression. Infect Immun. 42: 747-754.
Swayne, D.E., Glisson, G.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez D.L., Nair, V. L. (2013) Diseases of Poultry. (13th ed.) Wiley-Blackwell,
17. USA.
Tumpey, T. M., Kapczynski, D.R., Swayne, D.E. (2004) Comparative susceptibility of chickens and turkeys to avian influenza A H7N2 virus infection and protective efficacy of a commercial avian influenza H7N2 virus vaccine. Avian Dis.
18. 48: 167-76.
Webester, R.G., Cox, N.J., Sthor, K. (2002) WHO manual on animal influenza diagnosis and
19. surveillance. (1st ed.) Geneva, Switzerland.
Zarkov, I., Tsachev, I. (2011) Detection of antibodies against avian isolate of influenza A virus H9N2 in turkey poults after infection via different routes. Trakia J Sci. 9: 87-91.

Effect of infectious bursal disease virus on response of turkeys to infection by avian influenza virus (H9N2)

Hashemzade, F.[4], Mayahi, M.[1*], Shoshtary, AH.[2], Seyfi Abad Shapouri, M.R.[3], Gourbanpoor, M.[3]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[2]*Department of Avian Diseases, Razi Vaccine and serum research institute, Karaj,Iran*

[3]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[4]*Graduated from Avian Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of ahvaz, Ahvaz, Iran*

(Received 8 March 2017, Accepted 19 May 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Infection by infectious bursal disease virus (IBDV) in turkeys may lead to immunosuppression effects and therefore turkeys could not resist against pathogenic or less pathogenic agents. **OBJECTIVE:** The aim of present study was to examine the effects of IBDV on response of turkey's poults to avian influenza virus (AIV).**METHODS:** A total of 100 day-old poults were divided randomly into 4 equal groups. Groups 1 and 2 were infected with 104CID50 of IBDV by oral route at 1 day of age; groups 1 and 3 were infected with 10^6 EID50 of AIV (H9N2) by the oculo-nasal route at day 30. Poults of group 4 were kept as uninfected control group. All groups were vaccinated with Newcastle disease virus (NDV) vaccine. Blood samples via wing web were collected at days 0, 30, 37, 44, 51 and 58 and anti- NDV and anti-AIV serum titers were measured by HI test. At days 33 and 41 three poults of each group were euthanized and their splenic lymphocytes proliferation repose to phytohaemagglutinin was assessed. **RESULTS:** Influenza clinical signs were prolonged and more intensive in group 1 than group 3. The mean HI titers to NDV were significantly lower in group 1 than group 3, in all sampling times, but anti-AIV titers were significantly lower in group 1 compared to group 3 from days 14 AIV (H9N2) post infection. The lymphocyte proliferation assay with PHA did not show any differences between groups 1 and 3. **CONCLUSIONS:** IBDV suppresses immune response in turkey and causes prolonged and more intensive clinical signs after challenge with AIV.

Keyword: turkey, avian influenza, IBD, immunosuppression

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean cellular stimulation index percent in spleen cells of turkey. Different letter in each column indicted significant differences between mean titers (p<0/05).

Table 2. Mean antibody titer against influenza virus H9N2 in turkey. Different letter in each column indicted significant differences between mean titers (p<0/05).

Table 3. Mean antibody titer against Newcastle virus in turkey. Different letter in each column indicted significant differences between mean titers (p<0/05).

***Corresponding author's email: mansoormayahi@scu.ac.ir, Tel: 061-33330073, Fax: 061-33360807**