

## تأثیر بیماری بوریس عفونی بر پاسخ جوجه بوقلمون به ویروس آنفلوآنزای (H<sup>9</sup>N<sub>2</sub>) طیور

فرهاد هاشم زاده<sup>۴</sup> منصور میاحی<sup>۱\*</sup> عبدالحمید شوشتری<sup>۲</sup> مسعود رضا صیفی آبادشاپوری<sup>۳</sup> مسعود قربانپور<sup>۳</sup>

(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 بوریس (IBDV) ممکن است به سرکوب ایمنی در بوقلمون منجر شده و باعث گردد بوقلمون‌ها نتوانند در برابر عوامل بیماری‌زا یا کم‌بیماری‌زا مقاومت نمایند. هدف: بررسی تأثیر IBDV بر پاسخ بوقلمون به ویروس آنفلوآنزای 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 ۱۰۴CID<sub>50</sub> از IBDV به روش خوراکی آلوده شدند. در ۳۰ روزگی جوجه‌های گروه‌های اول و سوم با ۱۰۶EID<sub>50</sub> از AIV (H<sup>9</sup>N<sub>2</sub>) به روش داخل بینی-چشمی آلوده شدند. جوجه‌های گروه چهارم به عنوان شاهد غیر آلوده نگاه‌داری 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 آنفلوآنزا آن‌ها با آزمایش HI اندازه‌گیری شد. در روزهای ۳۳ و ۴۱ سه پرنده از هر گروه آسان‌کشی گردید و پاسخ تکثیر لئوسیت‌های طحالی آن‌ها به فیتوهمگلوتینین ارزیابی شد. علائم آنفلوآنزا 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 لئوسیت‌های طحالی به فیتوهمگلوتینین بین دو گروه ۱ و ۳ تفاوت معنی‌داری نداشت. نتیجه‌گیری نهایی: ویروس بیماری بوریس عفونی می‌تواند باعث تضعیف پاسخ ایمنی در بوقلمون شده و علائم شدیدتر و بادوام‌تر آنفلوآنزا را باعث شود.

**واژه‌های کلیدی:** بوقلمون، آنفلوآنزای طیور، بیماری عفونی بوریس، سرکوب ایمنی

### مقدمه

خاص این ویروس می‌تواند در ماکیان با سن ۳ هفته و مسن‌تر تا ۶۰٪ تلفات را باعث شوند. عفونی شدن ماکیان با IBDV در روزهای اولیه 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 طبیعی IBDV بوده ولی عفونت تجربی بوقلمون با IBDV، فقط تحت بالینی بوده است (۱۲). این ویروس بعد از ۵ بار پاساژ در بوقلمون باعث ضایعات میکروسکوپی در بورس شده، آنتی‌ژن IBDV در بورس فابریوس بوقلمون‌ها قابل ردیابی و جداسازی بوده است (۷). با توجه گزارشات در خصوص 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 آنفلوآنزای H<sup>9</sup>N<sub>2</sub> صورت گرفت.

### مواد و روش کار

**آماده‌سازی ویروس‌ها (تکثیر ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ**

**H<sup>9</sup>N<sub>2</sub>):** به منظور تکثیر ویروس AIV از روش تأیید شده سازمان بهداشت جهانی استفاده شد (۱۸). بر این اساس ابتدا ویروس آنفلوآنزای پرندگان

ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان از لحاظ بیماری‌زایی به بیماری‌زای کم و زیاد تقسیم بندی می‌شوند. ویروس‌های آنفلوآنزا عمدتاً در دستگاه گوارش و تنفس تکثیر پیدا می‌کنند. ویروس‌های تحت تیپ H<sup>9</sup> به طور معمول جزء ویروس‌های با بیماری‌زایی کم بوده و باعث بیماری خفیف و یا متوسط می‌شوند (۱۶). ویروس‌های H<sup>9</sup>N<sub>2</sub> 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 آنفلوآنزا، در بوقلمون بیشتر از سایر گونه‌ها دیده می‌شود (۱۹) و گزارش شده است بوقلمون نسبت به ماکیان به عفونت با ویروس‌های آنفلوآنزای با بیماری‌زایی کم مستعدترند، زیرا دوز عفونی‌زایی این ویروس برای بوقلمون به مراتب کمتر از ماکیان است (۱۷). عفونت‌های فصلی ناشی از ویروس‌های آنفلوآنزای در بوقلمون اهلی، اردک و همچنین انسان با مهاجرت پرندگان آبی در ارتباط است. ویروس آنفلوآنزای H<sup>9</sup>N<sub>2</sub> یکی از عوامل پنهانی تهدید آینده سلامت بشری محسوب شده است (۲، ۱۶).

بیماری بوریس عفونی یک بیماری حاد ویروسی خیلی عفونی‌زا ماکیان جوان است که هدف اصلی عامل، بورس فابریوس است (۱۶). سویه‌های



لنفوسیت‌های طحال به فیتوهمگلوتینین اندازه‌گیری شد. برای این کار از روش Nusbbaum 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 ۴۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و به ازای هر ۱ ml ۰/۱ سلول، ۱/۴ ml از محلول لیز کننده گلبول قرمز اضافه شد و مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. پس از آن دومتبه سانتریفوژ تکرار و رسوب سلولی (لنفوسیت‌ها) دوبار با RPMI 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 فیتوهمگلوتینین ۲٪ (Sigma، آمریکا) مجاور و به دو حفره باقیمانده از هر نمونه به عنوان شاهد به جای فیتوهمگلوتینین بافر نمکی فسفات اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار گرم‌خانه‌گذاری شدند و پس از آن میزان سلول‌های موجود در هر حفره با کیت تعیین تکثیر سلول به روش MTT (Roche)، آلمان ارزیابی و میزان تکثیر لنفوسیت‌ها (Stimulation Index) در پاسخ به ترکیب میتوززای فیتوهمگلوتینین 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 افزار SPSS نسخه ۱۶ 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 AIV + IBD)	۴۲/۴ ± ۱۵/۳ <sup>a</sup>	۲۵/۲ ± ۷/۹ <sup>a</sup>
۲ (آلوده شده با IBD)	۴۷/۱ ± ۴/۸ <sup>a</sup>	۳۲/۲ ± ۱۳/۲ <sup>a</sup>
۳ (آلوده شده با AIV)	۳۶/۶ ± ۲ <sup>a</sup>	۴۳/۵ ± ۲۸ <sup>a</sup>
۴ (کنترل)	۲۴/۱ ± ۵/۸ <sup>a</sup>	۷۰/۱ ± ۸/۸ <sup>b</sup>

تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (A/Chicken/Iran/AH/۰۶/۱) از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (ایران) تهیه و در حفره آلتوتئیک تخم مرغ جنین‌دار ۹-۱۱ روزه تلقیح شد، ۲-۳ روز 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 آلتوتئیک تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شده، جمع‌آوری و در فریزر نگهداری شد. در هنگام استفاده، EID<sub>50</sub> (دوز عفونی کننده‌ی ۵۰٪ تخم مرغ‌های جنین‌دار ماکیان) این ویروس براساس فرمول رید و مانس (۱۴) تعیین شد و جهت القاء عفونت تجربی به هر جوجه بوقلمون میزان EID<sub>50</sub> ۱۰<sup>۶</sup> از ویروس تلقیح گردید (۱۸).

**تکثیر ویروس بیماری بارس عفونی:** به منظور تکثیر ویروس بارس 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 ۱ ml ۰/۱ از سوسپانسیون ۱۰٪ بارس فابریسیوس آلوده به سویه‌ی خفیفی از IBVD 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 هود لامینار 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 ۴۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به عنوان منبع ویروس، جدا شده در فریزر نگهداری شد و قبل از استفاده CID<sub>50</sub> آن با تلقیح به شکل داخل بورس به ۴۵ قطعه جوجه گوشتی در سن ۳۳ روزگی براساس روش رید و مانس (۱۴) تعیین گردید. جهت القاء عفونت تجربی به طریق دهانی به هر جوجه بوقلمون میزان CID<sub>50</sub> ۱۰<sup>۴</sup> 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 IBVD، 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 IBVD 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 CID<sub>50</sub> ۱۰<sup>۴</sup> از IBVD عفونی شدند (۳). جوجه‌های گروه‌های اول و سوم، در سن ۳۰ روزگی به روش داخل بینی-چشمی با EID<sub>50</sub> ۱۰<sup>۶</sup> ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> آلوده شدند (۱۸). جوجه‌های گروه چهارم به عنوان شاهد غیر آلوده به AIV و IBVD 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



جدول ۲. میانگین عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> در بوقلمون‌ها. حروف متفاوت در هر ستون نشانه تفاوت معنی دار ( $p < 0.05$ ) بین میانگین‌تیرهاست ( $p < 0.05$ ).

سن به روزگروه	۳۰	۳۷	۴۴	۵۱	۵۸
۱ (IBD + AIV)	۷۳ ± ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۳/۲ ± ۰/۲۱ <sup>a</sup>	۴/۷ ± ۰/۱۹ <sup>a</sup>	۴/۳۵ ± ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۴/۲۵ ± ۰/۳ <sup>a</sup>
۲ (آلوده شده با IBD)	۷۵ ± ۰/۱۷ <sup>a</sup>	۰/۹ ± ۰/۱۸ <sup>b</sup>	۷/۱ ± ۰/۱ <sup>b</sup>	۰/۸ ± ۰/۱۳ <sup>b</sup>	۰/۴ ± ۰/۱۸ <sup>b</sup>
۳ (آلوده شده با AIV)	۷۴ ± ۰/۱۶ <sup>a</sup>	۳/۲ ± ۰/۱۱ <sup>a</sup>	۶/۹ ± ۰/۱۸ <sup>c</sup>	۶/۰۵ ± ۰/۱۹ <sup>c</sup>	۵/۷ ± ۰/۲۵ <sup>c</sup>
۴ (کنترل)	۷۴ ± ۰/۱۶ <sup>a</sup>	۷/۳ ± ۰/۱۳ <sup>b</sup>	۷/۲ ± ۰/۱۳ <sup>b</sup>	۰/۷ ± ۰/۱۵ <sup>b</sup>	۰/۶ ± ۰/۱۶ <sup>b</sup>

جدول ۳. میانگین عیار پادتن ضد ویروس واکسن نیوکاسل در بوقلمون‌ها. حروف متفاوت در هر ستون نشانه تفاوت معنی دار ( $p < 0.05$ ) بین میانگین‌ها است.

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

## نتایج

نشانه‌های درمانگاهی متعاقب چالش با 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.

یکی دو روز بعد از چالش با ویروس آنفلوانزا، پرندگان گروه‌های ۱ و ۳، نشانه‌هایی مانند بی‌حالی، ژلودگی 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، نیوکاسل و آنفلوانزا: سرم ۲۰ جوجه بوقلمون در یک روزگی از نظر پادتن ضد IBDV با روش الیزا منفی بود. میانگین و انحراف معیار عیار پادتن ضد ویروس NDV و AIV جوجه بوقلمون‌ها در یک روزگی به ترتیب  $0/5 \pm 1/5$  و  $3/95 \pm 1/3$  بود.

تأثیر IBD بر ایمنی سلولی بوقلمون: جدول ۱ میانگین شاخص تکثیر سلول‌های طحالی (stimulation index) بوقلمون‌های گروه‌های مختلف در ۳۳ و ۴۱ روزگی را نشان می‌دهد. همانگونه که قابل مشاهده است، شاخص فوق که بیانگر سطح ایمنی سلولی است، در سن ۳۳ روزگی یعنی ۳ روز پس از چالش با AIV تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف ندارد ( $p > 0.05$ )، ولی در سن ۴۱ روزگی در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به مراتب کمتر از گروه شاهد بوده است ( $p < 0.05$ ).

تأثیر IBD بر ایمنی هومورال نسبت به ویروس‌های نیوکاسل و آنفلوانزا: جدول ۲ و ۳ به ترتیب میانگین عیار پادتن ضد AIV و ضد NDV بوقلمون‌های گروه‌های مختلف در روزهای مختلف را نشان می‌دهند. میانگین عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا در گروه‌های ۱ و ۳ در تمامی زمان‌های خون‌گیری بجز روزهای ۳۰ و ۳۷ (همزمان با اوایل عفونت

تجربی) به مراتب بیشتر از دو گروه دیگر بوده است ( $p > 0.05$ ). نتایج نشان می‌دهد که گروه‌های هدف با موفقیت آلوده شده‌اند و ویروس بیماری بوریس عفونی باعث کاهش معنی‌دار عیار پادتن در گروه ۱ نسبت به گروه ۳ در ۴۴، ۵۱، ۵۸ روزگی شده است ( $p < 0.05$ ). سطح پایین پادتن ضد AIV گروه‌های ۲ و ۴ حکایت از عدم وقوع آلودگی طبیعی یا انتقال آلودگی از گروه‌های ۱ و ۳ به این گروه‌ها است.

همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، پادتن ضد NDV در گروه‌های ۳ و ۴ در تمامی زمان‌های خونگیری به مراتب بیشتر از دو گروه دیگر بوده است ( $p < 0.05$ ) یعنی ویروس بیماری بوریس عفونی باعث کاهش معنی‌دار عیار پادتن در گروه‌ها ۱ و ۲ نسبت به گروه ۳ و ۴ را باعث شده است ( $p < 0.05$ ).

## بحث

ویروس‌های آنفلوانزا با بیماری‌زایی کم مثل ویروس آنفلوانزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> باعث بیماری تنفسی و افت تولید تخم در بوقلمون می‌شوند، اما در شرایط موجود در مزارع پرورش طیور شامل مدیریت، بیماری‌های باکتریایی و ویروسی همزمان، عوامل سرکوب‌گر 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 پاسخ ضد ویروس آنفلوانزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> صورت گرفت نشان داد که تلقیح جدا به‌ای از IBDV با منشاء ماکیان به جوجه بوقلمون‌های یک روزه با علایم درمانگاهی خاصی همراه نیست. در توافق با یافته‌ی فوق Nusbaum و همکاران در سال ۱۹۸۸ در تلقیح جوجه بوقلمون‌های یک‌روزه با ویروس بوریس عفونی جدا شده از بوقلمون بیان داشته‌اند که عفونت با ویروس فوق یک بیماری نهفته‌ی بدون علایم درمانگاهی است. Giambrone و همکاران در سال ۱۹۷۸ نیز اعلام نموده‌اند که تلقیح تجربی (قطره چشمی) ویروس بیماری بوریس عفونی



سویه ویروس، متفاوت است. در توافق با یافته‌ی ذکرشده مطالعه حاضر، Sharma و همکاران در سال ۱۹۸۳ و Confer و همکاران در سال ۱۹۸۱ نیز سرکوب گذرا در پاسخ بلاستوتونیک سلول‌های طحال و خون ماکیان به فیتوهمگلوتینین را گزارش نموده‌اند.

چنانکه در نتایج نیز اشاره شد، ویروس بورس عفونی باعث کاهش چشمگیر و معنی‌دار عیار پادتن ضد AIV و ضد NDV در گروه آلوده به IBDV نسبت به گروه غیر آلوده به IBDV گردیده است. اگرچه به نظر می‌رسد در خصوص این یافته نیز گزارشی در منابع موجود نیست ولی مطالعه‌ی Nusbaum و همکاران در سال ۱۹۸۸ مبنی کاهش ناگهانی شدید در تعداد پلاسماسل‌ها متعاقب آلودگی به IBDV تأیید کننده این یافته است. Dohms و همکاران نیز در سال ۱۹۸۸، گزارش نموده‌اند که در ماکیان گوشتی مبتلا به IBDV عیار پادتن ضد آنتی‌ژن‌های دریافتی (بروسلا آبوروس و گلبول قرمز گوسفند) کاهش می‌یابد. Faragher و همکاران هم در سال ۱۹۷۴ اعلام نموده‌اند که سرکوب تولید پادتن ضد ویروس نیوکاسل در ماکیان گوشتی 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 پاسخ ایمنی هومورال ضد نیوکاسل و ضد آنفلوانزا، تشدید علائم آلودگی به ویروس آنفلوانزا شده H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> ولی در زمان‌های ارزیابی شده (۳۳ و ۴۱ روزگی) تأثیر قابل توجهی بر ایمنی سلولی ندارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان وظیفه خود می‌دانند از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی 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: 842-846.
3. Chui, C., Thorsen, J. (1984) Experimental infection of turkeys with infectious bursal disease vi-

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

مطالعه حاضر نشان داد اگرچه آلودگی با ویروس گامبور باعث تلفات ناشی از ویروس آنفلوانزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> نمی‌شود ولی باعث تشدید و دوام بیشتر علائم ناشی از آن می‌گردد. بررسی‌ها نشان داد گزارش منتشر شده‌ای در این خصوص در بوقلمون وجود ندارد ولی بررسی‌های مشابهی (۹، ۱۳) در ماکیان صورت گرفته است که دال بر سرکوب پاسخ نسبت به عوامل عفونی متعاقب آلودگی به IBDV است. در تأیید یافته‌ی فوق Nusbaum و همکاران در سال ۱۹۸۸ و Chui و همکاران در سال ۱۹۸۴ اعلام نموده‌اند که آلودگی جوجه بوقلمون‌ها با IBD در یک روزگی با سرکوب پاسخ ایمنی همراه است. Motamed و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تلفیح تجربی ویروس آنفلوانزا سروتیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> در جوجه‌های گوشتی آلوده به ویروس بورس عفونی نشان داده‌اند که آلودگی جوجه‌های گوشتی یکروزه به ویروس گامبور منجر به افزایش زمان و شدت دفع ویروس آنفلوانزای پرندگان سروتیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> در اندام‌های مختلف شده و تلفات را افزایش می‌دهد. Ramirez-Nieto و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز گزارش کرده‌اند که عفونت اولیه با IBD ماکیان را خیلی مستعد عفونت ویروس آنفلوانزا می‌کند.

در مطالعه حاضر در بررسی تأثیر ویروس گامبور بر ایمنی سلولی (پاسخ تکثیر لنفوسیت‌های 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 ( $p > 0.05$ ) ولی در سن ۴۱ روزگی در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به مراتب کمتر از گروه شاهد است ( $p < 0.05$ ) که دال بر تأثیر منفی عفونت‌های ویروسی (عفونت با IBD یا AIV) بر ایمنی سلولی بوقلمون است ولی چون بین دو گروه ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $p > 0.05$ )، نمی‌توان با قطعیت نتیجه‌گیری نمود که ویروس گامبور باعث تضعیف ایمنی سلولی می‌گردد. با توجه به بررسی منابع به نظر می‌رسد در خصوص تأثیر ویروس گامبور بر ایمنی هومورال پرندگان شکی وجود نداشته باشد ولی در مورد تأثیرش بر ایمنی سلولی گزارشات متناقضی وجود دارد که شاید بخشی از این تناقض‌ها به روش ارزیابی ایمنی سلولی، سویه ویروس گامبور، سن پرند در هنگام آلودگی تجربی و روش تلفیح 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 میتوزن کونکاوالین A دیده شده است (۱۱). Chui و همکاران در سال ۱۹۸۴، نیز در بررسی تأثیر تلفیح 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 سرکوب شده و این سرکوب بسته به



- rus and the effect on the immunocompetence of infected turkeys. *Avian Dis.* 28: 197-207.
4. 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. *Am J Vet Res.* 42: 2109-2113.
  5. Dohms, J.E., Lee, K.P., Rosenberger, J.K. (1981) Plasma cell changes in the gland of Harder following infectious bursal disease virus infection of the chicken. *Avian Dis.* 25: 683-695.
  6. Faragher, J.T., Allan, W.H., Wyeth, C.J. (1974) Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Vet Rec.* 95: 385-388.
  7. Giambrone, J.J., Fletcher, O.J., Lukert, P.D., Page, R.K., Eidson, C.E. (1978) Experimental infection of turkeys with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 22: 451-458.
  8. 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. *Poult Sci.* 80: 1416-1424.
  9. 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.* 5: 276-280.
  10. Nili, H., Asasi, K. (2002) Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol.* 31: 247-252.
  11. Nusbaum, K.E., Lukert, P.D., Fletcher, O.J. (1988) Experimental infections of one-day-old poults with turkey isolates of infectious bursal disease virus 1. *Avian Pathol.* 17: 51-62.
  12. Oladele, O. A., Adene, D. F., Obi, T. U., Notidge, H. O. (2009) Comparative susceptibility of chickens, turkeys and ducks to infectious bursal disease virus using immunohistochemistry. *Vet Res. Commun.* 33: 111-121.
  13. 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 infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 54: 513-521.
  14. Reed, L.J., Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoint. *Am J Hyg.* 27: 493-497.
  15. 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 immune suppression. *Infect Immun.* 42: 747-754.
  16. Swayne, D.E., Glisson, G.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez D.L., Nair, V. L. (2013) *Diseases of Poultry.* (13<sup>th</sup> ed.) Wiley-Blackwell, USA.
  17. 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.* 48: 167-76.
  18. Webster, R.G., Cox, N.J., Sthor, K. (2002) *WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance.* (1<sup>st</sup> ed.) Geneva, Switzerland.
  19. 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.<sup>4</sup>, Mayahi, M.<sup>1\*</sup>, Shoshtary, A.H.<sup>2</sup>, Seyfi Abad Shapouri, M.R.<sup>3</sup>, Gourbanpoor, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup>Department of Avian Diseases, Razi Vaccine and serum research institute, Karaj, Iran

<sup>3</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>4</sup>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 10<sup>4</sup>CID<sub>50</sub> of IBDV by oral route at 1 day of age; groups 1 and 3 were infected with 10<sup>6</sup>EID<sub>50</sub> 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 response 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 indicated significant differences between mean titers ( $p < 0/05$ ).

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

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

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

