نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره نوزدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۲،
پیاپی ۴۶ :۷۹-۷۰

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

بررسی حضور ویروس بیماری بورس عفونی در ماکیان گوشتی فاقد علائم بیماری در شهرستان اهواز

رضا تقی پور[۱]، رمضانعلی جعفری[۲*]، سیده الهام رضاتوفیقی[۳]،فروغ طلازاده[۴]**

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استاد گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۴- دانشیار گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۵

چکیده

بیماری بورس عفونی (گامبورو) یک بیماری مسری در ماکیان نابالغ می باشد که عامل آن ویروس بورس عفونی می باشد. این بیماری به سه فرم بالینی خیلی حاد، حاد کلاسیک و تحت درمانگاهی مشاهده می شود. در فرم خیلی حاد و حاد کلاسیک بیماری دارای علائم مشخص است اما در فرم تحت درمانگاهی علائم کلینیکی مشخصی مشاهده نمی شود. گرچه عفونت تحت درمانگاهی هیچ مرگ و میری ایجاد نمی کند، اما منجر به اختلال در وزن گیری گله، سرکوب سیستم ایمنی و عدم موفقیت در واکسیناسیون علیه دیگر بیماری ها می شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی حضور ویروس بورس عفونی در گله های ماکیان گوشتی فاقد علائم درمانگاهی مشخص بیماری بود. بدین منظور از سی گله مرغ گوشتی در سن ده تا بیست روزگی ۳۴۴ نمونه بورس، جهت شناسایی ژن 2VP ویروس بورس عفونی با تکنیک RT-PCR جمع آوری شد. در پایان دوره رشد نیز ۴۲۰ نمونه سرم جهت بررسی حضور پادتن ضد ویروس بورس عفونی از گله های مورد مطالعه اخذ شد. ژن 2VP در چهار گله شناسایی شد و همچنین در (۹۰٪) ۳۷۶ نمونه سرم تیتر بالای پادتن ضد ویروس بیماری بورس عفونی مشاهده شد. با توجه به عدم دریافت واکسن در این گله ها و همچنین عدم وجود علائم بالینی، به نظر می رسد سویه های تحت درمانگاهی ویروس در منطقه در حال گردش هستند. با توجه به اینکه در برخی از گله های سرم مثبت ویروس شناسایی نشد به نظر می رسد آلودگی در این گله ها در زمانی غیر از زمان نمونه گیری برای تست RT-PCR رخ داده است و بنابراین تست های سرولوژی از جمله الیزا می توانند ارزیابی دقیق تری از احتمال گردش ویروس در یک منطقه را داشته باشند. این نتایج می تواند اهمیت لزوم واکسیناسیون علیه این ویروس در منطقه را مشخص کند.

واژه های کلیدی: ویروس بیماری بورس عفونی، گامبورو، الیزا، RT-PCR

*نویسنده مسئول اول : رمضانعلی جعفری

آدرس: گروه بهداشت دام ، طیور و آبزیان،دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه شهید چمران اهواز،اهواز ،ایران

**نویسنده مسئول دوم : الهام توفیقی

آدرس: گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم ، دانشگاه شهید چمران اهواز ،اهواز ،ایران

پست الکترونیکی : e.tofighi@scu.ac.ir ،

مقدمه

بیماری بورس عفونی Infectious bursal disease (IBD)) (گامبورو) یک عفونت ویروسی بسیار مسری در ماکیان نابالغ است که عامل آن IBD virus از خانواده بیرناویریده (Birnaviridae) و جنس آوی بیرناویروس (Avibirnavirus) می باشد. دو سروتیپ برای ویروس بیماری بورس عفونی شناسایی شده است. بین این دو سروتیپ ۳۰ درصد اشتراک ژنتیکی وجود دارد. هر دو سروتیپ در ماکیان، بوقلمون، اردک، مرغ دریایی و شترمرغ شناسایی شده اما فقط سروتیپ یک در ماکیان بیماریزایی ایجاد می کند (McFerran et al 1980; Homer et al 1992; Tacken et al 2004; Najafi et al 2018; Ali Khan et al 2019; Fan et al 2019). ژنوم ویروس از نوع RNA دو رشته‌ای می باشد که از ۲ قطعه A و B تشکیل شده است. ژنوم دارای پنج قسمت کد کننده پروتئین های VP1VP-۵ می باشد. ۲VP و ۳VP پروتئین های ساختاری ویروس اند. ۱VP، RNA پلیمراز ویروس و ۲VP پروتئین کپسید و ایمنوژن اصلی ویروس بورس عفونی است که با حدت، تروپیسم سلولی و تنوع آنتی ژنی ویروس مرتبط است. ۳VP در مورفوژنز و تکثیر ویروس دخالت دارد و پادگن خاص گروهی هر دو سروتیپ است. ۴VP یک پروتئاز ویروسی و ۵VP نیز در آزادسازی، تکثیر و فعالیت ضد آپوپتوزی ویروس دخیل است. قطعه A پروتئین های ویروسی (۲VP، ۳VP، ۴VP و ۵VP) ناحیه اصلی پادگنی IBDV را کد می کند، در حالی که قطعه B پروتئین ویروسی (۱VP) را کد می کند (Swayne et al 2020).

Jackwood و Michel طبقه بندی جدیدی از IBDV براساس اطلاعات ژنتیکی آن معرفی کردند (Michel and Jackwood 2017). بر پایه آن طبقه بندی و بر اساس حدت، ویروس سروتیپ ۱ به ۳ گروه طبقه بندی شده است که شامل گروه های تحت بالینی (Sub Clinical) ، حاد کلاسیک (Classical Virulent) و بسیار حاد (Very Virulent) می باشد. بر اساس ساختار آنتی ژنی سروتیپ ۱ به دو گروه کلاسیکال/استاندارد و واریانت (Variant) تقسیم می شود. با این حال جهش های دریفت پادگنی منجر به شکل گرفتن ساب تایپ های مختلف در این گروه ها شده است (Michel and Jackwood 2017). اقدامات پیشگیری در خصوص کنترل این ویروس بسیار پیچیده است به این دلیل که این عامل عفونی مرتبا دچار جهش، Reassortment در قطعات ژنومی و نوترکیبی میشود. همین عوامل میتوانند حدت ویروس را افزایش دهند و منجر به تغییرات در ساختار پادگنی و کاهش تاثیرات واکسن ها شوند (Michel and Jackwood 2017).

ویروس واریانت علی رغم عدم وجود علائم بالینی و تلفات، ولی ضایعات بورسی مشخصی ایجاد میکند. ماکیان تنها گونه ای هستند که علائم بالینی و ضایعات مشخص را هنگام مواجهه با این ویروس نشان میدهند (OIE 2004; Fan et al 2019; Xu et al 2020). نژادهای سبک و تخم گذار مانند لگهورن سفید شدیدترین ضایعات و علائم بالینی و بیشترین میزان تلفات را بروز می دهند. ویروس

های دارای حدت کلاسیک (CV) حدودا ۱۰ تا ۵۰ درصد تلفات همراه با علائم و ضایعات و ویروس بورس عفونی فوق حاد (VV) در حدود ۵۰ تا ۱۰۰ درصد تلفات همراه با علائم و ضایعات تیپیک ایجاد می کند (OIE 2004; Day et al 2019). ویروس تیپ ۱ بیماری بورس عفونی، گسترش جهانی دارد. اندام هدف ویروس این بیماری بورس فابریسیوس بخصوص لنفوسیت های B درحال تکثیر می باشد (Armstrong et al 1981; Michel and Jackwood 2017; Dey et

al 2019; Xu et al 2020). عفونت تحت بالینی IBD در مرغان آلوده با سن کمتر از ۳ هفتگی و مسن بروز پیدا می کند که با علائم آتروفی بورس قابل تشخیص است (Homer et al 1992; Dey et al 2019). گرچه عفونت تحت بالینی هیچ مرگ و میر ایجاد نمی کند، اما منجر به اختلال در وزن گیری گله، سرکوب سیستم ایمنی و عدم موفقیت آمیز بودن واکسیناسیون علیه دیگر بیماری ها می شود، همچنین شیوع عفونت های دیگر مانند کلی باسیلوز، سالمونلوز، کوکسیدیوز و هپاتیت تجمع گنجیدگی Inclusion Body (IBH Hepatitis) را افزایش می دهد، در نتیجه منجر به مرگ و میر بیشتر، عدم یکنواختی گله و افزایش طول دوره پرورش می شود که از نظر اقتصادی بسیار مهم می باشد (Goodall et al 1989; Homer et al 1992; Fan et al 2019). یکی از مهم ترین راه های پیشگیری از بیماری بورس عفونی واکسیناسیون می باشد ولی در ایران واکسیناسیون به صورت منظم و در همه گله ها انجام نمی شود. شناسایی ویروس در گله های مبتلا عمدتا بر اساس علائم بالینی، تست های سرولوژی و مولکولی انجام می شود.

در ایران ویروس بورس عفونی در سال ۱۹۸۱ از یک گله گوشتی جدا شد (Razmyar and Peighambari 2008). فرم فوق حاد بورس عفونی نیز در سال ۱۹۹۱ حتی در گله هایی که با واکسن اینترمدیت و اینترمدیت پلاس ایمن شده بودند پدیدار شد (Najafi et al 2018). رزمیار و پیغمبری (۲۰۰۸) ، نجفی و همکاران (۲۰۱۸) در ایران مطالعاتی در خصوص شناسایی ویروس در گله های واجد علائم بالینی انجام داده اند (Razmyar and Peighambari 2008; Najafi et al 2018)، اما در مطالعه حاضر، هدف بررسی حضور ویروس در گله های فاقد علائم بالینی که واکسن بورس عفونی را دریافت نکرده اند می باشد. نتایج این مطالعه میتواند در چگونگی اتخاذ سیاستهای موثر برای مقابله با این ویروس مفید باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه، ۳۰ گله گوشتی شهرستان اهواز که واکسن بیماری بورس عفونی را دریافت نکرده بودند، پس از ثبت مشخصات لازم (از قبیل نام فارم، تاریخ جوجه ریزی، تعداد جوجه های گله، سن، وزن نهایی و میزان تلفات) به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ جوجه های موجود در فارم نمونه گیری شد. بدین منظور بورس جوجه ها در سن ۱۰ تا ۲۰ روزگی به منظور ردیابی ویروس پس از آسان کشی، توسط پنس و قیچی استریل جداسازی و درون میکروتیوپ ۵ سی سی استریل در کنار یخ جهت انجام آزمایش RT-PCR به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز ارسال گردید. در مجموع ۳۴۴ نمونه بورسی از مجموع ۳۰ گله جمع آوری شد. در انتهای دوره پرورش و در کشتارگاه بمنظور بررسی سرولوژیک بیماری بورس عفونی به روش الایزا، ۴۲۰ نمونه خون از گله های مورد بررسی اخذ شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

جهت استخراج RNA از نمونه های بورس، از کیت تجاری (SinaPure Viral (Sinaclon; Iran استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میلی گرم از هر نمونه بورس جدا و به طور کامل له و همگن شد. سپس هر سه نمونه از یک گله با هم مخلوط شدند و مطابق دستورالعمل کیت، RNA آنها استخراج شد. در نهایت RNA استخراج شده در فریزر منفی هفتاد درجه سانتی گراد تا زمان انجام مراحل بعدی کار ذخیره شد. جهت سنتز cDNA از کیت شرکت سیناکلون (Sinaclon; Iran) استفاده شد و مطابق دستورالعمل کیت، cDNA سنتز شد.

واکنش PCR

جهت بررسی حضور ویروس بورس عفونی ژن ۲VP با کمک PCR تکثیر شد. توالی پرایمر رفت ۳′GCCCAGAGTCTACACCAT ۵′و پرایمر برگشت ۳′ATGGCTCCTGGGTCAAATCG ۵′ بود (Michel and Jackwood 2017). از ویروس تخفیف حدت یافته بیماری بورس عفونی سویه واکسن گامبو ال (Hungry, CEVAC GAMBO L) به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR دناتوراسیون اولیه به مدت ده دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه (۹۵ درجه سانتی گراد)، اتصال به مدت ۹۰ ثانیه (۵۷ درجه سانتی گراد) و سنتز به مدت ۹۰ ثانیه (۷۲ درجه سانتی گراد) تکرار شد. در نهایت سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت پنج دقیقه انجام شد (Michel and Jackwood 2017). برای انجام واکنش از مستر میکس شرکت امپلیکون (Denmark) با غلظت دو میلی مولار ۲MgCl استفاده شد. در نهایت محصول PCR روی ژل دو درصد برده شد. در صورت مشاهده قطعه به طول ۵۷۹ جفت باز واکنش مثبت در نظر گرفته می شد.

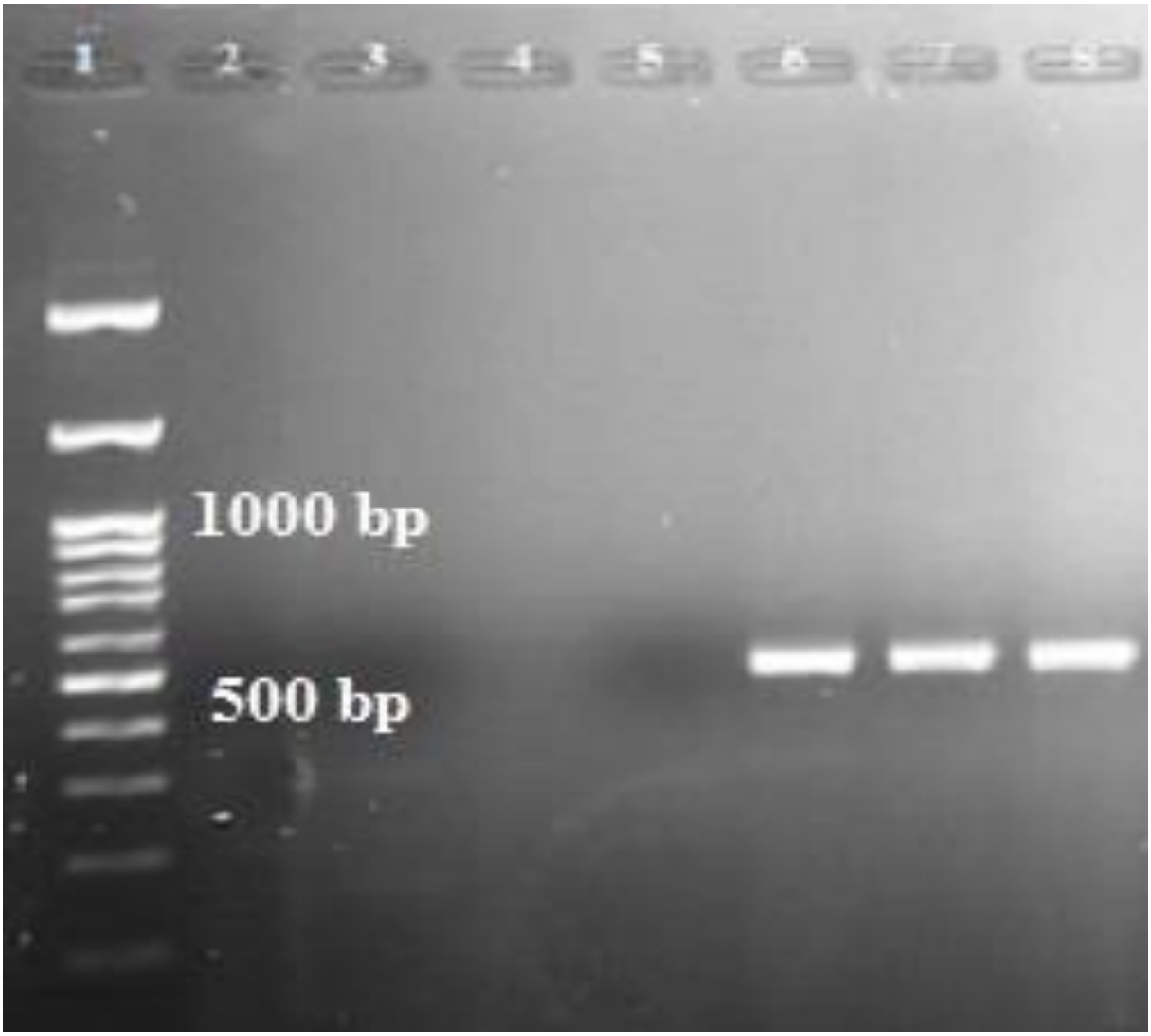
بررسی سرولوژی به روش الایزا:

خون های اخذ شده در کشتارگاه پس از استحصال سرم در آزمایشگاه، تا زمان انجام آزمایش الیزا در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور ردیابی آنتی‌بادی ضد IBDV از کیت ID.vet (ID.vet; France) استفاده شد و عیار پادتن ها براساس دستورالعمل کیت سنجش شد. جذب نوری نمونه¬ها پس از انجام آزمایش توسط دستگاه(BioRad; USA) ELISA Reader استخراج و توسط نرم¬افزار کیت تفسیر شد.

نتایج

استخراج RNA و واکنش RT-PCR:

از نمونه های جمع آوری شده به کمک کیت شرکت سیناکلون استخراج RNA صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که RNA از کیفیت مناسب برخوردار است. بعد از استخراج RNA سنتز cDNA انجام شد. در ادامه واکنش PCR به منظور تایید ویروس بورس عفونی انجام شد. نتایج RT- PCR چهار گله از مجموع ۳۰ گله مورد مطالعه دلالت بر وجود یک باند ۵۷۹ باز در ناحیه متغیر ۲VP داشت (عکس ۱).



عکس ۱. واکنش RT-PCR مربوط به نمونه های جمع آوری شده از گله های ماکیان گوشتی جهت شناسایی ویروس بیماری بورس عفونی (گامبورو). از چپ به راست گوده اول لدر ۱۰۰bp، گوده ۲ و ۳ و ۵ نمونه های منفی ، گوده ٤ کنترل منفی، گوده ٦ کنترل مثبت، گوده ۷ و ۸ نمونه های مثبت

نتایج بررسی سرولوژی به روش الایزا:

سرم های جدا شده از خون های اخذ شده در کشتارگاه توسط کیت تشخیصی بورس عفونی ID.vet مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام آزمایش الایزا، جذب نوری نمونه ها توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. براساس دستورالعمل کیت <۸۵۳Titer مثبت قلمداد شد. لذا از مجموع ۴۲۰ نمونه سرم اخذ شده از ۳۰ گله، ۳۷۶ نمونه دارای تیتر مثبت (۹۰ درصد) و ۴۴

نمونه (۱۰درصد) که دارای ≤Titer۸۵۳ بودند که از نظر پادتن ضد بورس عفونی منفی قلمداد شدند. به این ترتیب به جز ۳ گله در بقیه گله ها میانگین تیتر مشاهده شده بیش از ۸۵۳ بود. نتایج سرولوژی به تفصیل در جدول شماره ۱ آورده شده است

جدول شماره ۱: نتایج بررسی سرولوژی جهت حضور پادتن ضد ویروس بورس عفونی به روش الایزا

شماره گله	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت	تعداد نمونه منفی	بیشترین تیتر	کمترین تیتر	میانگین تیتر	درصد پراکندگی (CV)	نتیجه PCR
۱	۱۶	۶	۱۰	۱۹۷۵	۱	۸۲۵	۷۵	منفی
۲	۱۲	۱۲	۰	۱۱۲۷۰	۱۰۲۲۳	۱۰۷۵۸	۳	منفی
۳	۱۰	۱۰	۰	۱۳۰۵۳	۵۹۸۲	۹۵۷۴	۲۷	منفی
٤	۱۴	۱۴	۰	۱۱۱۱۶	۳۳۹۹	۷۵۰۱	۳۰	منفی
٥	۱۶	۱۶	۰	۱۳۶۵۶	۳۸۶۷	۸۶۳۲	۳۲	منفی
٦	۱۶	۱۶	۰	۱۰۷۸۹	۵۴۶۵	۸۵۳۸	۲۰	منفی
۷	۱۴	۱۴	۰	۱۲۸۶۱	۷۴۵۶	۱۰۰۹۴	۱۴	منفی
۸	۱۵	۱۵	۰	۱۱۱۹۷	۵۷۸۳	۹۲۵۷	۱۸	منفی
۹	۱۰	۱۰	۰	۸۹۳۹	۴۳۹۸	۷۰۵۷	۲۳	منفی
۱۰	۲۰	۶	۱۴	۲۰۸۸	۱	۶۳۷	۱۰۲	منفی
۱۱	۱۶	۳	۱۳	۱۴۹۶	۱	۵۴۴	۹۰	منفی
۱۲	۱۴	۱۴	۰	۲۷۱۲۵	۴۸۰۹	۱۳۷۸۲	۴۹	منفی
۱۳	۱۵	۱۵	۰	۲۶۸۳۲	۱۶۳۹۱	۲۲۴۷۶	۱۴	منفی
۱٤	۱۰	۱۰	۰	۲۷۵۲۹	۱۰۸۸۱	۲۰۲۷۷	۲۷	منفی
۱٥	۱۳	۱۳	۰	۱۱۴۸۹	۶۱۶۶	۸۸۸۷	۱۴	منفی
۱٦	۱۱	۱۱	۰	۲۷۵۷۷	۶۰۰۱	۱۸۰۶۴	۳۵	منفی
۱۷	۱۴	۹	۵	۲۷۵۶۹	۱	۱۰۲۷۹	۱۱۶	منفی
۱۸	۱۲	۱۲	۰	۱۲۴۱۸	۴۴۵۷	۸۸۴۸	۲۹	منفی
۱۹	۱۶	۱۶	۰	۱۵۴۶۰	۲۳۵۷	۷۸۷۰	۴۱	مثبت
۲۰	۱۵	۱۵	۰	۱۷۱۰۱	۵۸۳۱	۱۲۷۰۸	۲۷	مثبت
۲۱	۱۵	۱۵	۰	۲۸۰۰۶	۲۳۵۷۷	۲۶۶۷۸	۴	منفی
۲۲	۱۴	۱۴	۰	۱۷۱۹۱	۱۵۸۰۲	۱۶۶۸۷	۲	مثبت
۲۳	۱۱	۱۱	۰	۱۶۶۴۹	۱۲۳۲۲	۱۵۹۱۸	۸	منفی
۲٤	۱۷	۱۷	۰	۱۶۱۰۹	۴۷۳۶	۱۲۹۶۱	۲۴	منفی

۲۵	۱۲	۱۲	۰	۱۰۸۲۸	۴۱۱۵	۷۹۰۷	۲۴	منفی
۲۶	۱۷	۱۵	۲	۱۰۷۸۷	۵۶۷	۳۰۲۳	۸۸	منفی
۲۷	۱۷	۱۷	۰	۱۳۱۰۳	۶۱۰۰	۱۱۱۷۴	۱۷	مثبت
۲۸	۱۳	۱۳	۰	۱۲۱۴۴	۷۱۰۴	۹۱۳۵	۱۹	منفی
۲۹	۱۵	۱۵	۰	۱۲۲۵۴	۵۷۲۹	۹۰۶۷	۲۱	منفی
۳۰	۱۰	۱۰	۰	۱۲۵۱۴	۶۵۲۰	۹۶۲۳	۲۲	منفی
مجموع	۴۲۰	۳۷۶	۴۴	–	–	–		۴

بحث و نتیجه‌گیری

به دنبال اولین ظهور IBDV کلاسیک در آمریکا در سال ۱۹۵۷، یک سویه متفاوت از لحاظ آنتی ژنی در اواخر دهه ۱۹۸۰ در آمریکا گزارش شد که از ایمنی ایجاد شده توسط سویه های IBDV کلاسیک فرار می کرد. این نوع، واریانت نامگذاری شد. در حال حاضر واریانت IBDV به‌عنوان یک بیماری مهم اقتصادی در سراسر جهان گزارش شده است، زیرا باعث آسیب شدید به بورس شده و منجر به سرکوب سیستم ایمنی و ایجاد عفونت‌های تحت بالینی می‌شود. این عفونت ها، اغلب علت زمینه‌ای بیماری‌های تنفسی و روده‌ای در جوجه ها و همچنین شکست واکسیناسیون می شود. با این حال، در طول ۳۰ سال گذشته، به دلیل پیگیری فقط موارد vvIBDV، واریانت به طور ناخواسته نادیده گرفته شده است.

در ایران، ویروس بیماری بورس عفونی که باعث مرگ و میر کم در یک مزرعه مرغ گوشتی شد، برای اولین بار درسال ۱۹۸۱ توسط آقاخان و همکاران شناسایی شد. بعدا آنها یک سویه جدید IBDV را شناسایی کردند که باعث مرگ و میر به ترتیب ۷۵٪ و ۲۵٪ در مزارع مرغان تخمگذار و گوشتی شد (Tacken et al 2004).

در مطالعه حاضر، از مجموع ۳۴۴ نمونه بورس اخذ شده از ۳۰ گله گوشتی که به روش RT-PCR بررسی شدند درمجموع ۴ گله (۱۰ درصد) از نظر ویروس بورس عفونی مثبت شدند. با توجه به اینکه هیچ گونه علائم کلینیکی در این گله ها مشاهده نشده بود لذا ویروس های شناسایی شده از نوع تحت بالینی در نظر گرفته شدند.

Fan و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی سویه های جدید واریانت ویروس بورس عفونی در چین پرداختند. در این مطالعه که به روش RT-PCR روی ۳۵۶ نمونه مشکوک صورت گرفت ،۱۸۷ مورد (۵۲/۵ درصد از نمونه¬ها) مثبت شدند (Fan et al 2019). رزمیار و پیغمبری (۲۰۰۸) طی مطالعه ای بر روی گله گوشتی و پولت تخمگذار در ایران، به بررسی خصوصیات جدایه¬های ویروس بورس عفونی به روش RT-PCR/Restriction endonuclease assay پرداختند. طی آن مطالعه از ۴۹ نمونه جمع آوری شده ۳۷ مورد (۷۵/۵ درصد) از نظر IBDV مثبت شدند که ۳ مورد (۸/۱ درصد) الگوی مشابه به سوی کلاسیک و ۳۴ مورد (۹۱/۹ درصد) الگوی مشابه سویه فوق حاد را نشان دادند. لازم بذکر است در مطالعه ذکر شده نمونه

ها از جوجه های واجد علائم بالینی جمع آوری شده بود (Razmyar and Peighambari 2008).

Homer و همکاران (۱۹۹۲) به بررسی میزان شیوع بیماری بورس عفونی تحت بالینی در ۵ مزرعه گوشتی پرداختند و در این مطالعه که حاصل بررسی ماکروسکوپی و میکرسکوپی بورس فابریسیوس و همچنین بررسی میزان تیتر پادتن جوجه های گوشتی بود، با وجود اینکه هیچ علامت درمانگاهی مبنی بر بیماری IBD در پرندگان مشاهده نشد ، همه ۵ گله مورد آزمایش درگیری به عفونت را نشان دادند (Homer et al 1992).

Armstrong و همکاران (۱۹۸۱) در استان ساسکاچوان کانادا ۵ گله گوشتی را از نظر پادتن ضد IBD، وجود ضایعات هیستوپاتولوژیکی و نسبت وزن بورس/ بدن بررسی کردند. بر اساس یافته های آنها ۴ گله از ۵ گله مورد مطالعه در زمان کشتار دارای پادتن ضد IBD (بر اساس آزمایش Agar gel immune diffusion AGID)، ضایعات هیستوپاتولوژیک در بورس و کاهش نسبت وزن بورس/ بدن می بودند، علی رغم اینکه در هیچکدام از گله ها علائم بالینی و مرگ و میر ناشی از بیماری مشاهده نشد (Armstrong et al 1981).

نظافتی و همکاران (۱۳۹۲) ۵۰ گله گوشتی در شهرستان اراک را از نظر وجود عفونت تحت بالینی ویروس گامبورو مورد ارزیابی قرار دادند . در این مطالعه از جوجه های ۹ تا ۱۰ روزه به نسبت ۱ در ۱۰۰۰ از بافتهای بورس ، طحال و کلیه نمونه گیری بعمل آمد و به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند همچنین در این مطالعه اندیس بورس نیز بررسی شد که در نهایت هیچ گونه مورد مثبتی گزارش نشد (نظافتی و همکاران ۱۳۸۹).

در مطالعه حاضر بر روی گله های مرغان گوشتی شهرستان اهواز علاوه بر بررسی مولکولی از نظر IBD تحت بالینی ، همه گله ها از نظر پادتن ضد IBDV با آزمایش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که ۲۷ گله از مجموع ۳۰ گله از نظر پادتن ضد IBDV مثبت بودند.

Homer و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند پادتن های ضد IBDV دو هفته پس از آلودگی قابل ردیابی هستند و ۴ هفته پس از آلودگی به اوج خود می رسند همچنین نشان دادند پادتن های مادری ۳ الی ۴ هفته پس از هچ شدن جوجه ها ازبین می روند (Homer et al 1992)، لذا با توجه به این که گله های مورد مطالعه هیچ گونه واکسن ضد IBD دریافت نکرده بودند گله های با تیتر مثبت را علی رغم PCR منفی می توان آلوده به IBD تحت بالینی در نظر گرفت و این فرضیه تقویت می شود که آلودگی در سنین بالاتر و بعد از نمونه گیری از بورس اتفاق افتاده است.

Sing و همکاران (۱۹۹۲) تعداد ۳۲ گله طیور شامل ۱۰ گله گوشتی و ۲۲ گله تخمگذار در منطقه جابالپور هند را از نظر وجود پادتن ضد IBD به روش AGID بررسی کردند. طی این مطالعه از مجموع ۱۱۱۷ سرم بررسی شده ۳۱۴ مورد (۲۶/۷درصد) از نظر پادتن IBD مثبت بودند . طی این مطالعه ۵۶/۶۱ درصد نمونه¬های اخذ شده از گله های گوشتی از نظر پادتن ضد IBD مثبت بودند، علی رغم اینکه هیچکدام از این گله ها دارای علائم بالینی بیماری بورس عفونی نبودند (Sing and Dhawedkar 1992).

Xu و همکاران (۲۰۱۹) پاسخ ایمنی میزبان به دو سویه IBDV را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مطالعه آنها نشان داد سویه واریانت پاسخ هومورال ضعیف تری در مقایسه با سویه فوق حاد ایجاد می کند، با این حال این

دو سویه از نظر سرکوب سیستم ایمنی یکسان عمل می کنند. سویه های واریانت جدا شده در مطالعه فوق به جوجه هایSPF سه هفته ای تزریق شد ولی در هیچ کدام علائم بالینی آشکاری مشاهده نشد، با این حال این ویروس ها باعث آتروفی بورس و سرکوب شدید سیستم ایمنی در جوجه های آلوده شدند (Xu et al 2020).

مکانیسم دقیق تاثیر IBD تحت بالینی بر سودآوری صنعت تولید جوجه های گوشتی هنوز مشخص نیست. با این حال، تاثیر آن ممکن است ناشی از سرکوب سیستم ایمنی میزبان و عفونت های متعاقب آن باشد. عدم مشاهده علائم بالینی احتمالا به دلیل درجه سرکوب سیستم ایمنی و/یا مقاومت وابسته به سن باشد. سرکوب سیستم ایمنی ناشی از IBD در جوجه‌های گوشتی با انواع سندرم‌های بالینی مانند بیماری مزمن تنفسی، کوکسیدیوز، IBH و قانقاریا مرتبط است. چنین بیماری هایی معمولا در سن ۴ هفتگی (زمانی که پادتن های مادری IBD از بین رفته اند) متعاقب سرکوب سیستم ایمنی ناشی از عفونت های ویروسی طبیعی IBD دیده می‌شوند. اگرچه بیشترین تاثیر ویروس روی سیستم ایمنی زمانی است که عفونت ویروس IBD در اوایل زندگی رخ می دهد، اما سرکوب سیستم ایمنی همچنان در پرندگانی که در ۴ تا ۶ هفته ای آلوده می شوند نیز رخ می دهد (Goodall et al 1989).

نتیجه گیری

با توجه به تاثیر سویه های تحت بالینی ویروس بورس عفونی بر بازدهی تولید و عدم موفقیت در واکسیناسیون، ارزیابی حضور این ویروس در گله های ماکیان و معرفی واکسن موثر ضروری به نظر می رسد. در مطالعه حاضر در ۴ گله از ۳۰ گله مورد بررسی ویروس شناسایی قرار گرفت و در ۲۷ گله بعد از پایان دوره رشد تیتر بالای پادتن IBDV مشاهده شد. نظر به عدم دریافت واکسن در این گله-ها و همچنین عدم وجود علائم بالینی، به نظر می رسد سویه های تحت بالینی ویروس در منطقه در حال گردش هستند و منجر به مثبت شدن نتایج PCR و یا تست های سرمی می شوند. با توجه به اینکه در برخی از گله های سرم مثبت ویروس شناسایی نشد به نظر می رسد آلودگی در این گله ها در زمانی غیر از زمان نمونه گیری برای تست PCR رخ داده است و بنابراین تست های سرمی از جمله الیزا می توانند ارزیابی دقیق تری از احتمال چرخش ویروس در یک منطقه را داشته باشند. این نتایج می تواند اهمیت لزوم واکسیناسیون علیه این ویروس در منطقه را مشخص کند.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت های مالی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل گرنت شماره ۱۴۰۱,۶۵۸SCU.SB انجام شده است.

منابع

۱. نظافتی، د. (۱۳۸۹). بررسی فرم تحت بالینی گامبورو به روش مولکولی PCR در مرغداری های گوشتی شهرستان اراک. پایان نامه دکترای حرفه ای، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ۹۹۳.

2. Ali Khan, R.S., Habib, M., Ali, W., Shah, M.S., Ashraf, A., Tahir, Z.A., Helal, Z.H., Khan, M.I., Mahboob, Sh., Ghanim, K.A., Al -Misned, F. 2019. Phylogenic analysis of Infection Bursal Disease viruses according to newly proposed model of classification into geno-groups, *J Infect Public Health*, **12:** 410-418.
3. Armstrong, L.D., Table, H., Ridell, C. (1981). Subclinical IBD in commercial

broilers Flocks in Saskatchewan, *Can J Compart Med*, **45:** 26-33.

4. Dey, S., Pathak, D.C., Ramamurthy, N., Maity, H.K., Chellapa, M.M. (2019). Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Vet Med*, **10:** 85-97.

5. Fan, L., Wu, L., Hussain, L., Gao, L., Zeng, X., Wang, Y., Gao, L., Li, K., Wang, Y., Liu, C., Cui, H., Pan, Q., Zhang, Y., Liu, Y., He, H., Wang, X., Xiaole, Qi., (2019). Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China. *Vet Microbiol*, **230:** 212-220.

6. Goodall, E. A., Mcllroy, S. G., and McCracken, R. M. (1989). Economic effect of subclinical infection bursal disease on broiler production. *Avian Pathol*, **189:** 465-480.

7. Homer, B.L., Butcher, G.D., Miles, R.D., and Rossi, A.F. (1992). Subclinical infection bursal disease in an integrated broiler production operation. *J Vet Diagn Invest*, **4:** 406-411.

8. McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Conner, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S., and Allan, G.M. (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol*. **9:** 395-404.

9.Michel, L.O., and Jackwood, D.J. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch Virol***162:** 3661-3670.

10. Najafi, H., Hosseini, H., Kasaee, M., Aghaiyan, L., Ziafati, Z., Hajizamani, N., Rajeooni, A., Modiri Hamdan, A., Sadat Mousavi, F., and Galyanchi langeroudi, A. (2018). Molecular Characterization of a very Virulent Infectious Bursal Disease Virus from Iran Demonstrates its Similarity with Recent Isolates from the 11. Middle East. *Iran J Virol*, 12: 1-5

Razmyar, J., and Peighambari, S.M. (2008). Rapid differentiation between very virulent and classical infection bursal disease viruses isolated in Iran by RT-PCR/REA. *Int J of Vet Res*. 2:111-117.

12. Singh, K.C.P., and Dhawedkar, R.G. (1992). Prevalence of Subclinical infection bursal disease and its significance in India. *Trop Anim Health Prod*, **24:** 204-206

13. Swayne, D.E., Boulianne, M., Logue, C.M., McDougald, L.R., Nair, V., Suarez, D.L. (2020). Disease of poultry. 14th edition, WILEY Blackwell, New Jersey, U. S. A, 258-259.

14. Tacken, M.G., Thomas, A.A., Peeters, BP., Rottier, P.J., Boot, H.J. (2004). VP۱, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-liked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. *Arch Virol*, **149:** 2245-2260.

15. Word Organization for Animal Health (Office International des Epizooties). (2004). Chapter 2-1-7 Infection bursal disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, ۵th d, OIE, Paris: 817-832.

16, Xu, A., Pei, Y., Zhang, K., Xue, J., Ruan, S. and Zhang, G., 2020. Phylogenetic analyses and pathogenicity of a variant infectious bursal disease virus strain isolated in China. *Virus research*, *276*, p.197833.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 19, Issue1,
Spring & Summer 2023

Investigation of the presence of infectious bursal disease virus in broiler chicken flocks without disease symptoms in Ahvaz city

Reza Taghipour[1] ، Ramezan Ali Jafari[*2] ، Seyedeh Elham Rezatofighi[**3] ، Forough Talazadeh[4]

1. *Postgraduate student; Department of Livestock, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz; Ahvaz; Iran*
2. *Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran university of Ahvaz; Ahvaz; Iran*
3. *Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz; Ahvaz; Iran*
4. *Associate Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz; Ahvaz; Iran*

Received: 28 May 2023 *Accepted: 6 September2023*

Abstract

Infectious bursal disease (IBD) (Gumboro) is a contagious disease in immature chickens, which is caused by IBD virus. The disease is observed in three clinical forms of very virulent (VV), classical virulent (CV), and sub-clinical (SC). The VV and CV forms of the disease show specific signs; however, no specific clinical symptoms are observed in the SC form. Although SC infection does not cause any mortality, it leads to flock weighing disorder, suppression of the immune system, and failure to vaccinate against other diseases. The aim of this study was to investigate the presence of infectious bursal virus in broiler flocks without specific clinical signs of the disease. For this purpose, 344 bursal samples were collected from 30 broiler chicken flocks at the age of 10 to 20 days, to identify the VP2 gene of the IBDV by RT-PCR. At the end of the breeding period, 420 serum samples were taken from the studied flocks to investigate the presence of antibodies against IBDV. VP2 gene was detected in four flocks and also high antibody titer of IBDV was observed in 376 (10%) serum samples. According to the lack of vaccination in these flocks and the absence of clinical symptoms, it seems that sub-clinical strains of the virus are circulating in the region. Considering that the virus was not detected in some flocks with positive serum, it seems that the infection occurred at a time other than the time of sampling for RT-PCR and therefore, serological tests, including ELISA, can have a more accurate assessment of the possibility of virus circulation in an area. These results can determine the importance of vaccination against this virus in the region.

Keywords: Infectious bursal disease virus, Gumboro, ELISA, RT-PCR

** Corresponding author: Ramezan Ali Jafari*
Address:Department of Livestock, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran university of Ahvaz; Ahvaz; Iran
E. mail: jafari.ramzanali@scu.ac.ir
*** Corresponding author: Seyedeh Elham Rezatofighi*
Address:Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E. mail: e.tofighi@scu.ac.ir