DOI: 10.22092/vj.2018.120380.1426
شماره ۱۲۰ پاییز ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) جوجه‌ها در عفونت همزمان بیماری بورس عفونی و آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2

• **نجمه معتمد (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیق و تشـخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

• **منصور میاحی**
بخش بهداشت و بیماریهای طیور گروه علوم درمانگاهی،دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران ، اهواز، ایران

• **علی خدادادی**
بخش ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز، ایران

• **مسعودرضا سیفی آباد شاپوری**
بخش میکروب شناسی، گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

• **رمضانعلی جعفری**
بخش بهداشت و بیماریهای طیور گروه علوم درمانگاهی،دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران ، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۱۱-۰۲ تاریخ پذیرش:۱۳۹۷-۰۱-۱۸

Email: motamed62@yahoo.com

چکیده

امروزه گستردگی ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 به حدی است که به صورت یک بیماری اندمیک در قسمت اعظم خاورمیانه در آمده است. از سوی دیگر بیماری گامبورو یک عفونت ویروسی شایع درجوجه‌ها است که باعث تخریب و کاهش پاسخ ایمنی به بیماری‌ها می‌گردد. مطالعات کمی در مورد تاثیر ویروس بیماری گامبورو برای ایمنی ذاتی صورت گرفته است. در این مطالعه فعالیت کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی (NK) در عفونت همزمان ویروس بیماری گامبورو با ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در جوجه بررسی شد. بدین منظور ۳۲ قطعه جوجه از مرغ مادر جهاد خریداری و به صورت تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. در یک‌روزگی دو گروه ۱ و ۲ ویروس بیماری بورس عفونی با دوز CID_{50} 10^3 به روش داخل بورس و در ۳۰ روزگی گروه‌های ۱ و ۳ ویروسH9N2 با دوز EID_{50} 10^6 به روش داخل بینی- چشمی تلقیح شدند، یک گروه هم به صورت شاهد که هیچ ویروسی به آن تلقیح نشده بود تا پایان دوره نگه‌داری شدند. ۷ روز پس از تلقیح ویروس آنفلوانزا طحال جوجه‌ها برداشت و کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی (NK) با استفاده از کیت تجاری Cytotoxicity Detection assay Kit plus LDH محصول شرکت Roche ارزیابی شد. بیشترین فعالیت کشندگی مربوط به گروه آنفلوانزا بود با این حال تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف دیده نشد. بنابراین ویروس بیماری گامبورو و یا عفونت همزمان دو ویروس گامبورو یا آنفلوانزا در جوجه‌ها سبب کاهش پاسخ سلول‌های کشنده طبیعی نشده است.

کلمات کلیدی: سلول‌های کشنده طبیعی، گامبورو، لاکتات دهیدروژناز، طحال، آنفلوانزا

Veterinary Researches & Biological Products No 120 pp: 57-63

Evaluation of Natural killer cell activity after coinfection of chickens with Infectious bursal disease and Avian influenza virus H9N2

By: Motamed, N., (Corresponding Author) Avian Diseases Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute,Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), Karaj, Iran. Mayahi, M., Avian Health and Disease department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. Khodadadi, A., Immunology Department, Faculty of Medicine, Jondi Shapour University, Ahvaz, Iran. Seifi Abad Shapouri, M.R., Microbiolog Departmenty , Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. and Jafari, M., Avian Health and Disease department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

Received: 2018-01-22 **Accepted: 2018-04-07**

Email: motamed62@yahoo.com

Avian influenza virus subtype H9N2 is an endemic viral disease in middle east. On the otherhand Infectious bursal disease virus is a widespread infection in chicken which causes vast destruction of immune response to various diseases. Few studies on effect of the virus on innate immunity has been done. In this research we assesed NK cell activity after coinfection of chickens with IBD virus and Avian influenza virus H9N2. Thirthy two chickens were divided in four groups randomly. Group 1and 2 were inoculated with 10^3 CID50 IBD virus at one day old intra bursaly.at thirthy days old chickens in groups 1 and 3 were inoculated with 10^6 EID50 oculonasaly. Seven days after influenza virus infection chickens were euthanized and their spleens used for NK cell activity evaluation by Cytotoxicity Detection assay Kit plus LDH, Roche. The most activity was belonged to influenza infected groups but the differences was not Meaningful. So we can concluded that IBD and AI infection has no effect on NK activity.

Key words: Natural Killer Cells, Gumboro Disease, LDH, Spleen, Influenza

مقدمه

بیماری آنفلوانزای طیور (AI) Avian influenza یکی از بیماری‌های مهم تنفسي، واگیردار و شایع طیور و با قدرت انتشار سریع می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزای طیور به خانواده ارتومیگزوویریده (Orthomyxoviridae) تعلق دارند. این ویروس‌ها دارای ژنوم هشت قطعه‌ای با پولاریته منفی هستند. بر اساس حدت و بیماری‌زایی در طیور ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به دو پاتوتیپ بسیار بیماری‌زا HPAI وکم بیماری‌زا LPAI تقسیم می‌شوند. ویروس‌های آنفلوانزای با بیماری‌زایی کم مانند تحت تیپ H9N2 سبب بیماری خفیف تنفسی، افت تولید تخم‌مرغ و در برخی موارد تلفات کم می‌شوند. البته نشانه‌های این ویروس در مرغداری‌های کشور به این صورت نبوده و اغلب اوقات به دلیل همراه شدن با بیماری‌های دیگر از جمله عوامل سرکوب‌کننده ایمنی مانند بیماری گامبورو علائم و خسارات شدیدی به بار می‌آید. بیماری گامبورو اولین بار توسط کاسگرو در سال ۱۹۶۲ تشخیص داده شد (۳). در سال ۱۹۷۲ آلن تضعیف ایمنی ناشی از این ویروس در ابتدای زندگی جوجه‌ها را گزارش کرد(۱). آلودگی به این ویروس در کشور ما به طور وسیعی شایع است. اندام هدف ویروس گامبورو بورس فابریسیوس و لمفوسیت‌های B است. که سبب تخریب دائمی اندام بورس و ضعف شدید پاسخ پادتنی در پرنده مبتلا می‌گردد. تاثیر این ویروس بر ایمنی سلولی و لمفوسیت‌های T ناپایدار گزارش شده است (۹ و ۱۴). سلول‌های NK از مغز استخوان منشاء می‌گیرند و شباهت زیادی با لمفوسیت‌های T دارند. در انواع مهره‌داران این سلول‌ها به عنوان یکی از اولین سدهای دفاعی بدن محسوب می‌شوند که با انترفرون گاما فعالیت‌شان افزایش می‌یابد. توزیع بافتی این سلول‌ها در بدن جوجه و میزان آن در طحال جوجه یک درصد سلول‌های این بافت گزارش شده است (۶ و ۱۱). برای بررسی تاثیر ویروس بیماری گامبورو بر جنبه‌های مختلف سیستم ایمنی یکی از انتخاب‌ها ارزیابی فعالیت کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی (NK) به دست آمده از جوجه‌های آلوده به ویروس در مواجهه با سلول‌های سرطانی هدف می‌باشد. برای انجام این ارزیابی از سلول‌های NK طحال جوجه استفاده می‌شود (۲). مطالعات کمی درباره تاثیر ویروس بیماری گامبورو بر فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی و یا فعالیت این سلول‌ها در عفونت هم‌زمان گامبورو با بیماری‌های دیگر صورت گرفته است و سعی ما در این مطالعه بررسی تأثیر ویروس بیماری گامبورو بر فعالیت کشندگی

سلول‌های NK به تنهایی و نیز در زمان مواجهه پرنده دچار ضعف ایمنی با ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 بود.

مواد و روش کار

تکثیر و تعیین عیار ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2

به منظور تکثیر ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 از روش تأیید شده‌ی سازمان بهداشت جهانی استفاده شد (۲۳). بر این اساس ابتدا ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 (A/Chicken/ Iran/AH-1/06) از مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (ایران) تهیه و در حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۱-۹ روزه تلقیح شد، ۳-۲ روز پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تخم‌مرغ‌ها از انکوباتور خارج و به مدت یک شب در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شده، جمع‌آوری و در فریزر نگه‌داری شد. در هنگام استفاده، EID۵۰ (دوز عفونی‌کننده‌ی ۵۰ درصد تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ماکیان) این ویروس براساس فرمول رید و مانش (۱۳) تعیین شد و جهت القاء عفونت تجربی به هر جوجه میزان EID۵۰ $۱۰^{۶}$ از ویروس آنفلوانزا تلقیح گردید.

تکثیر وتعیین عیار ویروس بیماری بورس عفونی

ویروس گامبورو مورد استفاده در این بررسی ویروس کلون شده‌ی IR۴۹۹ (GeneBank, accessionnumber: EU 09153) بود که متعلق به سویه‌های بسیار بیماری‌زا طبقه‌بندی می‌شود (very virulent) ازمؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد (۱۸). به منظور نگه‌داری ویروس بیماری بورس عفونی، ویروس تهیه شده در ظروف درب دار استریل، در مجاورت آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای تکثیر ویروس بیماری بورس عفونی، ۲۰ قطعه جوجه یک روزه خریداری و در یک محل کاملاً مجزا نگه‌داری شدند. این جوجه‌ها در تمام مدت دوره پرورش به دان استریل به صورت آزاد دسترسی داشتند. در سن ۲۰ روزگی از ورید بالی جوجه‌ها خون‌گیری به عمل آمده و پس از جداسازی سرم، میزان پادتن ویژه بیماری بورس عفونی و بیماری نیوکاسل با آزمایش الایزا (Flock Check IDXX, USA) و ممانعت از هماگلوتیناسیون ردیابی گردید و پس از تایید نداشتن پادتن ویژه بیماری گامبورو و نیوکاسل، جوجه‌ها با ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون ۱۰ درصد بورس فابریسیوس آلوده به ویروس گامبورو با دوز EID۵۰ $۱۰^{۳}$ و از راه داخل بورس تلقیح ۷۲ ساعت پس از تلقیح تمام جوجه‌ها کشته و بورس آنها تحت شرایط بهداشتی برداشته شد. بورس‌های جمع‌آوری شده با قیچی در هاون چینی استریل خرد شده و در بافر سالین فسفات (PBS)، سوسپانسیون ۱۰ درصد آن تهیه گردید. سوسپانسیون با دور ۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد، مایع رویی جدا شده و تا هنگام آزمایش در فریزر ۷۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد تعداد ۵۵ قطعه جوجه یک روزه خریداری و در دو قفس تا سن ۲۱ روزگی تحت شرایط محیطی کنترل شده و دسترسی آزاد به آب و غذای استریل نگهداری شدند. خوراک جوجه‌ها پس از پیچیده شدن در فویل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد استریل و سپس در اختیار آن‌ها قرار گرفت. جوجه‌ها در سن ۲۱ روزگی به ۱۱ گروه ۵ تایی با قرار دادن دیواره‌های موقت جدا شدند. به ۱۰ گروه، ۰/۱ میلی لیتر از رقت‌های مختلف ویروس گامبورو به روش قطره‌ی چشمی تلقیح شد. به گروه ۱۱ به عنوان کنترل همان مقدار آب مقطر تزریق و در محل جداگانه‌ایی نگه‌داری شد. با مشاهده نشانه‌های بالینی جوجه‌ها، تلفات و کالبدگشایی، CID۵۰ آنها با استفاده از فرمول ریدومانش محاسبه گردید(۱۳).

طرح آزمایش

سی و هفت قطعه جوجه مادر بومی یک روزه از گله مرغ مادر بومی جهاد خریداری و ۵ قطعه در روز اول جهت تعیین میزان پادتن ویژه ویروس آنفلوانزا و ویروس بیماری بورس عفونی به روش انسانی کشتار و سرم خون‌شان پس از سانتریفوژ جدا گردید. باقی جوجه‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه مساوی ۸ تایی تقسیم شدند و تحت شرایط بهداشتی مشابه و استاندارد تا پایان دوره آزمایش در مکان مجزا و دسترسی آزاد به آب و دان استریل نگه‌داری شدند.

جوجه‌های گروه اول و دوم در سن یک‌روزگی به ویروس بیماری بورس عفونی با دوز CID۵۰ $۱۰^{۳}$ به روش داخل بورس تلقیح شدند. جوجه‌های گروه سوم و چهارم به ویروس بیماری بورس عفونی آلوده نشدند. در سن ۲۹ روزگی، از هر گروه از طریق ورید بال و برای تعیین عیار پادتن مادری ممانعت‌کننده از هماگلوتیناسیون (HI) ضد آنفلوانزا و نیوکاسل خون‌گیری شدند (۲۱). همچنین برای اطمینان از عدم آلودگی به ویروس بیماری بورس عفونی در جوجه‌های آلوده نشده و افزایش عیار پادتن ضد گامبورو در جوجه‌های آلوده شده در یک روزگی، میزان پادتن ضد ویروس گامبورو به روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اطمینان از منفی شدن پادتن‌های مادری ضد ویروس آنفلوانزا، جوجه‌های گروه ۱ و ۳ در سن ۳۰ روزگی به مکان دیگری منتقل شده و هر جوجه با ۰/۱ میلی لیتر از مایع آلانتوئیک حاوی EID۵۰ $۱۰^{۶}$ ویروس آنفلوانزا H۹N۲ به روش چشمی- بینی تلقیح شدند (جدول ۱). هر کدام از جوجه‌های گروه ۲ و ۴ نیز حجم مساوی از PBS استریل را به همان شیوه دریافت کردند. جوجه‌ها بعد از تلقیح، روزانه ۴ بار از نظر ثبت نشانه‌های درمانگاهی و تلفات تحت نظر قرار گرفتند.

نمونه‌برداری

هفت روز پس از تلقیح ویروس آنفلوانزا، پس از آسان‌کشی طحال هر جوجه به صورت جداگانه با رعایت شرایط استریل برداشت شد.

ارزیابی کشندگی سلول‌های NK

سلول‌های افکتور (سلول‌های کشنده طبیعی NK cells)

در روز ۷ پس از آلودگی طحال جوجه‌های هر گروه پس از آسان‌کشی با رعایت شرایط استریل به صورت جداگانه خارج شده و سریعا در کنار یخ داخل محیط انتقال "با فرفسفات سالین حاوی آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ" (۱۵) به آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز منتقل شدند. بر اساس مطالعات صورت گرفته تعداد سلول‌های NKدر خون محیطی و طحال جوجه‌ها ۱

درصد لمفوسیت‌هاست و تعداد گلبول‌های سفید جوجه‌ها حدود ۱۱۰۰۰ در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (۶ و ۱۱).

در زیر هود هر طحال در یک پتری استریل به کمک قسمت کند قیچی به آرامی له شد، سپس با یک سرنگ، ۵ میلی لیتر محیط کشت آماده RPMI ۱۶۴۰ به داخل طحال با فشار تخلیه شد به صورتی که سلول‌های جدا شده و با مایع از طحال خارج شوند. ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی در یک فالکون استریل تخلیه و محلول فایکول به آرامی روی سوسپانسیون به گونه‌ای تخلیه شد که فایکول در فاز بالا باقی بماند (overlayed) سپس با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های سفید در محل تماس دو مایع (Interface) شناور می‌شوند که با یک پیپت پاستور استریل به آرامی از داخل فالکون کشیده و سه بار با بافرفسفات pH =۷/۲ و یک بار هم با محیط RPMI ۱۶۴۰ شسته شدند. در آخرین دور مایع رویی دور ریخته و رسوب سلولی به همراه چند میلی‌لیتر محیط کشت داخل فلاسک کشت سلولی ریخته و به انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه منتقل شد(۱۱).

شمارش سلولی

سلول‌های سانتریفوژ و با محلول تریپان بلو (TrypanBlue) رنگ‌آمیزی شدند. ۱۰ میکرو لیتر از مخلوط رنگ و سلول را روی لام هموسیتومتر ریخته و زیر میکروسکوپ ۴ خانه ۱۶ تایی مخصوص شمارش گلبول‌های سفید شمارش شدند. عدد به دست آمده به ۴ تقسیم و در 10^5 ضرب شد تا تعداد سلول در ۱ میلی‌لیتر به دست آید. با توجه به غلظت سلول‌ها رقیق‌سازی صورت گرفت تا به غلظت 10^5 در هر ۵۰ میکرولیتر برسد.

سلول‌های تارگت (سلول‌های توموری مارک MSB -MDCC -۱)

سلول‌های MDCC-MSB1 لاین سلولی لمفومای طحال جوجه‌ی مبتلا به ویروس بیماری مارک بود. سلول‌های هدف مورد استفاده از بانک ژن و سلول موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ایران (CGBRI) تهیه شدند. سلول ها مشابه سلول‌های افکتور رنگ‌آمیزی و شمارش شدند.

کیت ارزیابی کشندگی سلولی (Cytotoxicity Detection assay Kit plus (LDH

کیت خریداری شده محصول شرکت Roche آلمان بود. Cat. No. 04 744 926 001 به طور خلاصه این روش یک آزمایش رنگ‌سنجی غیر رادیو اکتیو است و پس از مجاور کردن سلول‌های طحالی که به عنوان افکتورند با سلول‌های هدف میزان آزاد شدن لاکتات دهیدروژنازاز سلول‌های لیز شده هدف با اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری می‌شود (۵، ۱۵ و ۲۲). به دلیل حضور سلول‌های توموری MDCC- MSB-1به عنوان هدف فعالیت کشندگی ارزیابی شده در این روش حاصل از سلول‌های NK است.

روش آزمایش

در پلت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای رقت‌های متوالی از سلول‌های افکتور (NK) در مقدار کافی محیط کشت تهیه شد (حجم نهایی هر رقت در هر حفره ۵۰ میکرولیتر). تمام نمونه‌ها به صورت ۳ تایی کار شدند. تعداد 10^4×(۰/۲۵-۱) سلول در هر حفره برای این آزمون استفاده شد. به هر حفره حاوی رقتی از سلول‌های افکتور، ۵۰ میکرولیتر سلول

$$\text{درصد کشندگی}(\%) = \frac{\text{جذب نوری مخلوط سلولهای هدف و افکتور} - \text{جذب نوری کنترل سلولهای (افکتور)} - \text{کنترل حداقل} \times 100}{\text{کنترل حداکثر} - \text{کنترل حداقل}}$$

هدف (تارگت) اضافه شد. سپس پلت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصدد یاکسیدکربن و ۹۰ درصد رطوبت به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام این زمان ۵ میکرولیتر محلول لیز کننده به کنترل اضافه و ۱۵ دقیقه دیگر پلت‌ها انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ لاندا مخلوط واکنش به تمام حفرات اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای 15° تا 25° دور از نور خورشید پلت‌ها انکوبه شدند. ۵۰ لاندا محلول توقف واکنش (stop solution) به تمام حفرات اضافه و ۱۰ ثانیه پلت‌ها روی شیکر قرار داده

جدول۲- میانگین درصد کشندگی سلولهای کشنده طبیعی

گروه	میانگین درصد کشندگی سلوهای NK
۱ (گامبورو+آنفلوانزا)	۳۱ درصد
۲ (گامبورو)	۲۷ درصد
۳ (آنفلوانزا)	۳۶ درصد
۴ (کنترل)	۹/۹ درصد

شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر در اسپکتوفتومتر خوانده شدند. درصد کشندگی سلول‌های NK با استفاده از فرمول پیشنهادی محاسبه گردید.

نتایج

میانگین درصد کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی با روش ارزیابی میزان لاکتات دهیدوژناز آزاد شده در جدول ذیل آمده است. گروه کنترل یعنی ۴ کم‌ترین میانگین کشندگی سلول به میزان ۹/۹ را داشت. بیشترین درصد کشندگی مربوط به گروه ۳ که در ۳۰ روزگی با ویروس آنفلوانزا تلقیح شده بودند، است. اختلاف میانگین در بین گروه‌های مختلف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p < ۰/۰۵$).

بحث

طبق اطلاعات ما تحقیق حاضر اولین بررسی درباره تاثیر ویروس بیماری بورس عفونی بر روی فعالیت کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی و تاثیر همزمان دو ویروس بیماری آنفلوانزا و گامبورو بر این سلول‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از میزان فعالیت کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی در گروه‌های مختلف که اختلاف معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) با یکدیگر نداشتند و نیز اینکه گروه‌های ۱ و ۳ که در ۳۰ روزگی به ویروس آنفلوانزا H9N2 آلوده شده بودند، افزایش درصد کشندگی در مقایسه با گروه ۴ و ۲ نشان دادند تاثیر این دو ویروس به طور همزمان و جداگانه بر روی فعالیت سلول‌های NK علی رغم افزایش نسبی دائمی و برجسته نبوده است. از آنجا که گامبورو یک ویروس double-stranded RNA است باعث تولید اینترفرون می‌شود و اینترفرون هم یک بوستر قوی برای تحریک سلول‌های NK می‌باشد. احتمالا به دلیل حضور ویروس آنفلوانزا سلول‌های NK طحال جوجه‌های ۱ و۳ فعال شده‌اند و میزان کشندگی بیشتری را از خود بروز می‌دهند. ظاهرا ویروس گامبورو بر فعالیت این نوع سلول‌ها اثری نداشته یا اثرش موقتی بوده و با گذشت حدود ۶ هفته از عفونت با ویروس گامبورو فعالیت این سلول‌ها به وضع طبیعی بازگشته است. احتمالا در صورتی که نمونه‌گیری در روزهای مختلف از طحال جوجه‌ها صورت می‌گرفت خصوصا در هفته اول زندگی جوجه‌ها امکان مطالعه سیر تاثیر بیماری گامبورو بر فعالیت این سلول‌ها فراهم و نتایج متفاوتی بدست می‌آمد. افت شدید پاسخ پرو لیفراتیو لمفوسیت‌های خون محیطی جوجه‌ها به کنکاوالین A به دنبال آلودگی با گامبورو توسط لیم در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است (۱۰). تست کشندگی سلولی با استفاده از روش (Chromium release assay (CRA و سلول‌های هدف LSCC-RP۹ توسط تامپسون و همکاران در جوجه‌های آلوده به ویروس برونشیت عفونی که قبلا به ویروس گامبورو مبتلا شده بودند انجام شد. فعالیت سلول‌های NK در گروه‌های آلوده به گامبورو و برونشیت عفونی بسیار بیشتر از جوجه‌های آلوده به برونشیت عفونی و کنترل بود ($P<۰/۰۸$) (۱۹). کشندگی سلول‌های NK طحال جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زا در برابر سلول‌های لمفوماي بیماری مارکلاین MSB-1 به عنوان سلول هدف توسط شارما و کولسون در سال ۱۹۷۹ نشان داده شده است(۱۶). شارما و لی در سال ۱۹۸۳ ضایعات گسترده و دائمی در بورس و ضایعات خفیف و موقتی در تیموس جوجه‌های آلوده شده با ویروس بیماری بورس عفونی را گزارش کردند. تاثیر این ویروس بر کشندگی سلول NK و پاسخ میتوژنیک توسط این دو محقق مطالعه شد. فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی به طور یکنواخت و دائمی متاثر نشده بود ولی پاسخ بلاستوژنیک سلول‌های طحال به فیتوهماگلوتینین کاهش پیدا کرده بود. در برخی موارد سطح کشندگی سلول‌های NK جوجه های آلوده به گامبورو بیش از گروه کنترل بود، اما این افزایش فعالیت یک الگوی واضح و ثابتی نداشت. در چند مورد سطح کشندگی سلول‌های NK جوجه‌های آلوده به گامبورو کمتر از گروه کنترل بود. شارما ولی بیان داشتند که ظاهرا سلول‌های کشنده طبیعی چندان تحت تاثیر تضعیف ایمنی گامبورو قرار نگرفته ولی افزایش تعداد سلول‌های کشنده طبیعی فعال در جوجه به دنبال آلودگی با این ویروس (گامبورو) هم رخ نمی‌دهد (۱۷). طبیعی شدن روند تولید پادتن و ساختار بافت‌های لمفوئیدی ۶ هفته پس از آلودگی با ویروس بیماری بورس عفونی گزارش شده است (۹). کورلی و گیامبرون (۲۰۰۲) تاثیر دو نوع واکسن حاد گامبورو را بر ایمنی سلولی و همورال جوجه‌ها بررسی و بیان کردندکه علی‌رغم اینکه تضعیف ایمنی هومورال در گامبورو با تخریب سلول‌های B و آتروفی بورس همراه است ولی تضعیف ایمنی سلولی ناشی از این دو نوع واکسن حاد بر جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زا با تغییر جمعیت سلول‌های CD8 و CD4 همراه نیست (۴). تست حساسیت تاخیری DTH به عنوان شاخص ارزیابی ایمنی سلولی توسط اوتیم در سال ۲۰۰۵ برای جوجه‌های آلوده به گامبورو به کار رفت که اختلاف معنی‌داری با وجود حضور پاسخ فشرده‌تر نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد(۱۲). سئو و همکاران (۲۰۰۱) برای ارزیابی ایمنی سلولی وابسته به سلول‌های CD8+ سلول‌های طحال جوجه‌ها روش مشابه روش استفاده شده در این مطالعه که لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول‌های لیز شده را اندازه‌گیری می‌کند به کار بردند (۱۵). تخریب تیموسیت‌های قشری در فاز حاد بیماری گامبورو که بیانگر نقص در سیستم ایمنی سلولی است توسط ویلیام و دیویدسون در سال ۲۰۱۰ گزارش شد (۲۴). تورو و همکاران در سال ۲۰۰۹ جمعیت سلول‌های B-IgM+ و T-CD4+ و T-CD8+ در طحال با فلوسیتومتری اندازه‌گیری و افزایش معنی‌دار سلول‌های CD4 در طحال ۸ روز پس از تلقیح گامبورو و عدم تغییر تعداد سلول‌های CD8 که بیانگر نقش این سلول‌ها در ایمنی حفاظتی علیه گامبورو است را نشان دادند (۲۰). این محققین نقش ایمنی سلولی در محافظت جوجه‌ها در برابرگامبورو را نتیجه‌گیری کردند. یاه و همکاران (۲۰۰۲) کاهش پاسخ لمفوسیت‌های طحال ۵ تا ۱۰ روز پس از تلقیح ویروس بیماری بورس عفونی به کنکووالین A را گزارش و ایمنی سلولی را در زمان عدم حضور پاسخ هومورال مسئول حفاظت در برابر گامبورو دانستند(۲۵).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان گفت که ویروس بیماری بورس عفونی حدود ۶ هفته پس از برخورد بر فعالیت کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی تاثیر قابل اندازه‌گیری با این روش نداشته است. این احتمال وجود دارد که تاثیر ویروس بیماری گامبورو بر این

نوع سلول‌ها موقت و گذرا بوده و پس از گذشت مدتی فعالیت این سلول‌ها به حالت طبیعی برگشته و حتی بیش از گروه کنترل شده است . تلقیح ویروس بیماری آنفلوانزا به جوجه‌ها همانطور که قابل پیش‌بینی بود سبب افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی شد.

تشکر و قدردانی

نویسنده بر خود لازم می‌داند از پرسنل و کارشناسان محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور که مراحل این تحقیق در آنجا صورت گرفته تشکر و قدردانی نماید.

منابع مورد استفاده

1. Allan, W.H., R.J.T. Faragher, and G.A. Cullen .1972. Immunosuppression by infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Veterinary research*, 90: 511-513.

2. Camacho, L., K.A. Schat, J.r. Brooks and D.I. Bounous .2003. Early cell-mediated immune responses to Marek s disease virus in two chicken lines with defined major histocompatibility complex antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 95:145-153.

3. Cosgrow, A.S. 1962. An apparently new disease of chicken, avian nephrosis. *Avian Diseases*, 6: 385-389.

4. Corley, M. and J.Giambrone .2002. Immunosuppression in Specific-Pathogen-Free Broilers Administered Infectious Bursal Disease Virus Vaccines by in ovo Route. *Avian Diseases*, 46(4): 810-815.

5. Fujii, S., H. Hamada, K. Fujimoto, T. Shimomura, and M. Kawakita.1999. Activated Dendritic Cells From Bone Marrow Cells of Mice Receiving Cytokine-Expressing Tumor Cells Are Associated With the Enhanced Survival of Mice Bearing Syngeneic Tumors. Blood, 93(12): 4328-4335.

6. Gobel, T.W., B. Kaspers , and L. Stangassinger .2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *International Immunology*, 13(6): 757-762.

7. Hagenaars, T. J., E. A.J. Fischer, C. A. Jansen, J.M.J. Rebel, D. Spekreijse, L. Vervelde, J.A. Backer, M.C.M. de Jong, A.P. Koets. 2016. Modeling the Innate Immune Response against Avian Influenza Virus in Chicken. PLOS ONE. *Journal. pone.*1-17.

8. Kim, I.J., K. Karaca, T.L. Pertile, S.A. Erickson, and J.M. Sharma.1998. Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 61: 331-341.

9. Kim, I.J., SK.You, H. Kim, H.Y. Yeh, and J.M. Sharma. 2000. Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *Journal of Virology,*74:8884–8892.

10. Lam, K.M. 1991. Infectious bursal disease virus type1-induced suppression of chicken lymphocyte response to mitogen. *Avian Pathology,* 20(2): 205-212

11. Neulen, M.L.,B.C. Viertlboeck , C. Straub, T. W. Göbel.2015. Identification of novel chicken CD4+ CD3− blood population with NK cell like features. *Developmental and Comparative Immunology*, 49(1):72-78.

12. Otim, M.O. and M. Bisgaard .2005. Aflatoxicosis, infectious bursal disease and immune response to Newcastle disease vaccination in rural chickens. *Avian Pathology*, 34(4): 319-323

13. Reed, L.J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoint. *American Journal of Hygince,* 27: 493-497.

14. Rehman, Z.U., C. Meng , S. Umar, M. Munir and C. Ding.2016. Interaction of infectious bursal disease virus with the immune system of poultry. *World's Poultry Science Journal*, 72: 805-820

15. Seo, S.H. and R.G.Webster .2001. Cross-reactive, cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets. *Journal of Virology,*75: 2516-2525.

16. Sharma, J.M. And B.D. Coulson.1979. Presence of natural killer cells in specific-pathogen-free chickens. *Journal of national cancer institute,* 63: 527-53.

17. Sharma, J.M. And L. Lee. 1983. Effects of infectious bursal disease on chicken natural killer cell activity and mitogenic response of chicken lymphoid cells: role of adherent cells in cellular immune suppression. *Infection and Immunology,* 42(2) : 747-754

18. Shoshtari A.H., S.A. Pourbakhsh, , H.A. Dadras, M.A. Bahmaninejad and R. Toroghi. 2004.Pathogenicity Study and Restriction Enzyme Profile of a Recently Isolated Infectious Bursal Disease Virus in Iran. *Arch. Razi Ins.* 58: 9-18

19. Thompson, G., H. Mohammed, B. Bauman, and S. Naqui .1997. Systemic and local antibody response to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with infectious bursal disease virus and control chickens. *Avian Disease*, 41: 519-527.

20. Toro, H., J.C. Effler, F.J. Hoerr, and F.W. van Ginkel.2009. Pathogenicity of Infectious Bursal Disease Virus Variant AL2 in Young Chickens. *Avian Diseases,* 53(1):78-82

21. Thayer, S.G. and B.W. Charles.2008. Serological Procedures. pp:222-229. In: Zavala, L.D.; Swayne, DE. Glison, J.R. Pearson, J.E. Reed, W.M. Jackwood, M.W. And Woolcock, PR.(eds), A Laboratory Manual For the Isolation, Identification and Character-

ization of Avian Pathogens. 5th edition, Omni press, Madison, USA.
22. Utke, K., S. Bergmann, N. Lorenzen, and U. Fischer.2007. Cell mediated cytotoxicity in rainbow trout, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 182-196.
23. WHO.2002. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf/Accessed 1/21/ 2018
24. Williams, H.A., and T.F. Davison .2005. Enhanced immunopathology induced by very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*, 34 (1): 4 – 14.
25. Yeh, H.Y., M.K. Njenga, And J.M. Sharma .2002. Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus infection. *Archive of Virology*,147(2): 285-304.