

## مقایسه‌ی بیماری‌زایی ویروس لارنگوتراکئیت عفونی در نیمچه‌های سویه‌های Bovans و LSL با روش‌های شاخص آسیب‌زایی داخل‌نایی و هیستوپاتولوژی

محمد مجید ابراهیمی<sup>۱\*</sup>، محمد صابر صبا<sup>۲</sup>، شهلا شاهسوندی<sup>۳</sup>، علیرضا یوسفی<sup>۱</sup> و محمد حسن حبل‌الورید<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد شرکت سیمرغ، واحد بویین زهرا، قزوین، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۱

### چکیده

بیماری لارنگوتراکئیت عفونی (Infectious laryngotracheitis; ILT) از بیماری‌های مسری ویروسی ماکیان است. هدف آزمایش کنونی مقایسه‌ی حساسیت نیمچه سویه‌های Bovans و LSL نسبت به ویروس بیماری‌زای ILT جدا شده از مزرعه به منظور آرایه سازوکار مناسب پیش‌گیری و کنترل بهتر این بیماری بود. پس از جداسازی، شناسایی و تایید ویروس ILT با روش‌های مولکولی و سرولوژی، عیار آن با روش Speaman-karber محاسبه شد. سپس ویروس ILT ( $EID_{50} > 10^2$ ) به ۳۰ قطعه نیمچه از هر سویه در سن ۸ هفتگی به صورت داخل‌نایی تلقیح شد. پرندگان مورد آزمایش از نظر بروز نشانه‌های بیماری به مدت ۸ روز تحت نظر قرار گرفتند. اختلاف معنی‌داری از نظر نشانه‌های بیماری، شاخص بیماری‌زایی داخل‌نایی (Intra-Tracheal Pathogenicity Index; ITPI) و شاخص هیستوپاتولوژی (Histopathology Index; HPI) بین سویه‌های Bovans و LSL وجود نداشت. نتایج این مطالعه نشان داد ویروس ILT در نیمچه‌های هر دو سویه از توان بیماری‌زایی نسبتاً یکسانی برخوردار است، هر چند به نظر می‌رسد به دلیل بالاتر بودن ITPI و HPI حساسیت نیمچه‌های سویه Bovans به ILT نسبت به سویه LSL بیش‌تر می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** لارنگوتراکئیت عفونی، مرغ تخم‌گذار، شاخص بیماری‌زایی، هیستوپاتولوژی

### مقدمه

طیور، به دلیل داشتن پروتئین با ارزش بیولوژیکی بالا همواره مورد توجه بوده است. در حال حاضر دو سویه‌ی پر تولید مرغ تخم‌گذار Bovans و LSL از نظر بالا بودن پیک تولید، حداکثر تعداد تخم‌مرغ تولیدی در کل دوره و کیلوگرم تخم‌مرغ به ازای هر مرغ در صنعت طیور تخم‌گذار به صورت تجاری مطرح هستند. برای پرورش دهندگان

وضعیت سلامت حیوانات تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله ژنتیک، تغذیه، سن، تنش‌های محیطی، سیستم مدیریتی، فصل، مقدار مؤثر عوامل بیماری‌زا، سابقه‌ی ایمنولوژیک، اپیدمیولوژی و وضعیت بیولوژیک آن‌ها قرار می‌گیرد (Van Dorp et al, 1998). تولید تخم‌مرغ خوراکی، به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات صنعت

\* نویسنده مسئول: محمد مجید ابراهیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

E-mail: mm.ebrahimi@rvsri.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

نای و ملتحمه آلوده به ویروس هستند (Ebrahimi et al, 2001; Oldoni et al, 2009).

وجود ویروس ILT را می‌توان با بررسی ترشحات به وسیله آزمایش‌های انتشار در آگار ژل و یا ایمنوفلوروسانس با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی ویروس، بررسی برای یافتن گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای در ترشحات یا مقاطع رنگ‌آمیزی شده بافت نای، تلقیح ترشحات نای یا سوآب‌های ملتحمه روی پرده‌ی کوریوآلتوتونیک جنین جوجه برای مشاهده‌ی قرچه‌های کرم رنگ یا پلاک (Ploque)، یا کشت آن‌ها روی سلول‌های کبد یا کلیه‌ی جنین و بررسی آثار آسیب سلولی، بررسی ترشحات با روش ردیابی DNA و یا تکثیر ژنوم ویروس با استفاده از PCR تعیین کرد (Shahsavandi et al, 2017; Swayne, 2006). شدت بیماری‌زایی ویروس ILT با شاخص بیماری‌زایی داخل نایی (Intra-Tracheal Pathogenicity Index; ITPI) و شاخص هیستوپاتولوژی (Histopathology Index; HPI) برآورد می‌شود (Guy et al, 1991; Guy et al, 1990). در پرندگان بهبود یافته از بیماری، ویروس می‌تواند به صورت نهفته در آید. چنین پرندگانی حاملین عفونت هستند و ویروس را برای چندین سال به صورت متناوب در دوره‌های طولانی دفع می‌کنند. با توجه به این که واکسن این بیماری در تمام نقاط استفاده نمی‌شود (Coppo et al, 2013)، شناسایی سویه‌های مقاوم‌تر به بیماری برای تولید محصولات سالم‌تر، عملکرد تولید بهتر، توأم با هزینه‌های درمان کم‌تر از اهمیت به سزایی برخوردار است. شناسایی سویه‌هایی که به برخی از بیماری‌ها از نظر ژنتیکی حساس‌ترند، می‌تواند نقش مهمی در آیش‌بندی و توصیه‌ی پرورش یک سویه با شاخصه‌های سلامت بهتر داشته باشد. هدف پژوهش کنونی، مقایسه‌ی حساسیت نیمچه سویه‌های Bovans و LSL نسبت به ویروس بیماری‌زای ILT جدا شده از مزرعه به منظور ارزیابی سازوکار مناسب پیش‌گیری و کنترل بهتر این بیماری و بهبود تولید و بهره‌وری در صنعت طیور بود.

طیور تخم‌گذار، صفاتی مانند تولید تخم مرغ، بلوغ جنسی، اندازه‌ی تخم مرغ، کیفیت پوسته، کیفیت تخم مرغ، باروری، قابلیت جوجه‌درآوری، اندازه‌ی جثه و ضریب تبدیل مصرف خوراک و حساسیت کم‌تر به بیماری‌ها از ویژگی‌هایی هستند که از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند.

انتخاب سویه‌هایی که حساسیت کم‌تری به بیماری‌ها دارند و همچنین انتخاب سازگارترین سویه از نظر شرایط محیطی، نقش پررنگی در سودآوری گله‌های مرغ تخم‌گذار دارد. پرندگانی که حساسیت بالایی به بیماری‌ها دارند، اغلب پیش از رسیدن به پیک تولید تلف خواهند شد و بنابراین، صرفه‌ی اقتصادی نخواهد داشت (Jovanovic et al, 2009). پیش از این، دانشمندان از وراثت‌پذیری صفت مقاومت طیور نسبت به بیماری‌های مارک و لکوز لئوئید پرندگان آگاهی داشتند (Stear et al, 2001)، اما رابطه‌ی بین ژنتیک با حساسیت یا مقاومت نسبت به سایر بیماری‌ها مانند لارنگو تراکیت عفونی (Infectious laryngotracheitis; ILT) همچنان مورد سوال است. بیماری ILT از بیماری‌های ویروسی مجاری تنفسی ماکیان است که مشکلات تنفسی، ایجاد موکوس، خلط‌های خونی و همچنین تلفات بالا از نشانه‌های بارز این بیماری است. ویروس عامل بیماری ILT، گالید هرپس ویروس تیپ ۱ (Gallid Herpes virus type 1)، جنس ایلتوویروس (Iltovirus)، زیر خانواده‌ی آلفا هرپس ویرینه (Alphaherpesvirinae) در خانواده‌ی هرپس ویرینه (Herpesviridae) است که به طور طبیعی از قسمت فوقانی مجاری تنفسی و ملتحمه چشم و همچنین از راه انتقال بین پرندگان آلوده و حساس، گله را درگیر می‌کند (Garcia et al, 2013; Ou & Giambrone, 2012). شکل حاد این بیماری در نیمچه‌های تخم‌گذار، با ایجاد عفونت و بیماری حاد تنفسی، نشانه‌های بالینی همچون ترشحات بینی، خس‌خس کردن و در پی آن سرفه و نفس زدن با دهان باز، تنگی نفس و دفع خلط آغشته به خون از نای را به دنبال خواهد داشت. در پرندگان مبتلا، ترشحات بینی، دهان،

## مواد و روش کار

### جداسازی و شناسایی ویروس ILT

ریخته شد و پس از بستن آگار، با استفاده از لوله‌ی شیشه‌ای نازک، الگوی چاهک‌ها شامل یک چاهک مرکزی و شش چاهک پیرامونی بر روی آن ایجاد شد. در چاهک مرکزی، سرم هیپرایمن ویروس ILT، در چاهک‌های پیرامونی نمونه‌های مورد مطالعه (اخذ شده از پرده‌ی کوریو آلتوتوئیک جنین‌هایی که پس از تزریق ویروس به تخم مرغ SPF تلف شدند) و در یک چاهک ویروس استاندارد ILT (به عنوان کنترل مثبت) ریخته شد. پلیت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت کافی به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. نمونه‌های مثبت با مشاهده رسوب خطی تشخیص داده شد (Fig. 1).



**Figure 1: Agar gel immunodiffusion test to detect infectious laryngotracheitis virus. The white arrow showing a precipitation line in specific reaction between the virus antigen and the antibody.**

### آزمایش مولکولی برای تأیید ویروس ILT

نمونه‌های DNA پرده‌ی کوریو آلتوتوئیک تخم مرغ‌های تلقیح شده با ویروس ILT پس از آماده‌سازی، با استفاده از کیت High Pure viral nucleic acid (Roche, Germany) استخراج و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت برای تکثیر ژن تیمیدن کیناز (Thymidine kinase; TK) ویروس ILT به طول ۶۷۵bp طراحی شد. توالی پرایمرها و برنامه‌ی دمایی مورد استفاده برای تکثیر این قطعه در Table 1 گزارش شده است. در کنار نمونه‌های تکثیر شده، دو نمونه کنترل مثبت و منفی به

پرندگان بیمار و تلف شده با سن ۲ ماه یک مرغداری صنعتی در استان تهران مشکوک به بروز بیماری ILT طیور، در شرایط بهداشتی کالبدگشایی شدند و از حنجره و نای آن‌ها نمونه‌برداری صورت پذیرفت. این مزرعه علیه ILT واکسینه نشده بودند. نمونه‌های اخذ شده در محلول بافر فسفات-سالین حاوی آنتی‌بیوتیک به مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی منتقل و ترشحات و سلول‌های اپی‌تلیال از نمونه‌های نای و حنجره جداسازی شد. در ادامه، نمونه‌ها در نوترینت براث حاوی پنی‌سیلین و استرپتوماسین قرار داده شدند و در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ و هموژن شدند. مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول فوقانی بر روی پرده کوریو آلتوتوئیک پنج تخم مرغ SPF (مؤسسه رازی) جنین‌دار ۱۱ روزه تلقیح و سپس تخم مرغ‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار داده شدند. تخم مرغ‌ها روزانه نوربینی شده و تخم مرغ‌های با جنین مرده طی ۲۴ ساعت نخست، حذف شدند. سایر تخم مرغ‌هایی که جنین آن‌ها پس از ۲۴ ساعت تا روز ۷ تلف شدند به سردخانه منتقل و سپس پرده کوریو آلتوتوئیک جنین‌ها از نظر تشکیل پوک بازرسی شدند. پرده‌های کوریو آلتوتوئیک نمونه‌های مثبت، جداسازی و برای آزمایش‌های پی‌آیند مورد استفاده قرار گرفتند (Fig. 1).

### آزمایش ترسیب در ژل آگار (آگار ژل ایمونودیفیوژن)

برای اثبات مثبت بودن جدایه‌ی ویروسی، با استفاده از آنتی‌سرم ویروس، وجود آنتی‌ژن ویروس ILT با کمک آزمایش آگار ژل ایمونودیفیوژن بر روی ترشحات نای و پرده‌ی کوریو آلتوتوئیک بررسی شد. برای این منظور، ژل نوبل آگار ۱/۵ درصد، کلرید سدیم ۸ درصد و آزیدسدیم ۰/۰۲ درصد در آب مقطر حل و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد اتوکلاو شد. مقدار پنج میلی‌لیتر از ژل ذوب شده در پلیت با قطر پنج سانتی‌متر

## عیارسنجی ویروس ILT

برای عیارسنجی ویروس، ابتدا رقت‌های سری ( $10^{-1}$ ) تا  $10^{-6}$  بر مبنای  $\log_{10}$  از ویروس جداسازی شده از پرندگان بیمار تهیه شد. در ادامه میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت ویروس بر روی پرده کوریوالانتوئیک جنین شش تخم مرغ SPF جنین‌دار تلقیح و سپس تخم‌مرغ‌ها به مدت هفت روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. بیشینه رقتی از ویروس که هیچ پوکی بر روی کوریوالانتوئیک ایجاد نکرد، به عنوان نقطه‌ی پایانی ثبت شد. عیار ویروس به روش Spearman-Kärber محاسبه شد که برابر با  $EID_{50}$   $10^{6.3}$  بود.

ترتیب شامل ویروس واکسن ILT و ویروس آبله طیور در نظر گرفته شد. محصول PCR مربوط به قطعه‌ی ژن TK همراه با مارکر وزن مولکولی DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و نمونه‌ها زیر نور UV آشکارسازی شدند. برای تعیین توالی محصول PCR، نمونه‌های خالص‌سازی شده با روش سنگر به صورت توالی رفت و برگشت، خوانش شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای مربوطه، توالی‌ها ویرایش شد و با توالی‌های ثبت شده ژن TK در بانک ژن برای ویروس ILT، هم‌ردیف‌سازی و مقایسه صورت گرفت.

**Table 1: The specific primer sequences and thermal cycler program used for amplification of infectious laryngotracheitis virus thymidine kinase gene**

Primer sequence	Forward	5'- ATGCCAAATTGGAGAGGTTG-3'		
	Reverse	5'- CGTCTGGTCGATTGAAGGAT-3'		
	Step	Temperature (°C)	Time	Number of cycle
PCR program	Initial denaturation	94	2 min	×1
	Denaturation	94	30 s	×30
	Annealing	58.5	40 s	
	Extension	72	60 s	
	Final extension	72	10 min	×1

طرح آزمایش: برای انجام این مطالعه، تعداد ۲۰۰ قطعه نیمچه تخم‌گذار از سویه‌های Bovans و LSL (۱۰۰ پرنده از هر سویه) در سن ۸ هفتگی انتخاب و در دو گروه مجزا نگهداری شدند. تمامی مراحل پرورش در سیستم قفس و شرایط پرورش بر اساس راهنمای پرورش هر سویه به صورت استاندارد انجام شد.

## شاخص بیماری‌زایی داخل نایی

دو گروه ۳۰ قطعه‌ای از هر یک از سویه‌های مورد آزمایش که علیه ILT واکسینه نشده بودند در سن هشت هفتگی به طور تصادفی انتخاب و در قفس‌های مخصوص و شرایط کنترل شده با فشار هوای منفی نگهداری شدند.

## آزمایش خشی‌سازی ویروس

آزمایش خشی‌سازی ویروس بر روی پرده کوریوالانتوئیک تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ۱۱ روزه انجام شد. رقت‌های ده برابر ویروس به حجم‌های مساوی از غلظت ثابت سرم اضافه و سپس مخلوط حاصله در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس هر رقت ( $10^{-1}$  تا  $10^{-6}$ ) از مخلوط سرم-ویروس، بر روی پرده کوریوالانتوئیک پنج تخم‌مرغ SPF جنین‌دار تلقیح و به مدت هفت روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. نقطه‌ی پایانی به عنوان بیش‌ترین رقتی از ویروس که هیچ پوکی روی پرده کوریوالانتوئیک تخم-مرغ‌ها ایجاد نکرد، ثبت شد.

### شاخص آسیب‌های میکروسکوپی

برای اندازه‌گیری HPI، هشت روز پس از تلقیح ویروس، حنجره و نای تعداد ۲۰ پرنده از هر سویه تشریح و سپس در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پس از طی مراحل روتین در آزمایشگاه آسیب‌شناسی، تهیه‌ی مقاطع بافت‌شناسی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی و بر اساس استانداردهای ارائه شده در Table 2 ضایعات بافتی مورد درجه‌بندی قرار گرفتند (Guy et al, 1990).

مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر ویروس ILT بیماری‌زا حاوی  $10^{5.2}$  EID<sub>50</sub> و ویروس به روش داخل نایی به هر جوجه تلقیح شد. چهار روز پس از تلقیح، تعداد ۲۰ نیمچه از هر سویه برای تعیین شاخص آسیب‌های میکروسکوپی کالبدگشایی شدند. بقیه‌ی نیمچه‌ها تا هشت روز پس از تلقیح، تحت نظر قرار گرفته و نتایج مشاهدات به صورت روزانه برای هر پرنده ثبت شد. مقادیر ITPI ویروس ILT به صورت ۰ = طبیعی، ۱ = بیماری تنفسی، ۲ = مرگ (Guy et al, 1991) ثبت شد.

**Table 2: Tracheal injury scoring after exposure of laying hens to infectious laryngotracheitis virus**

Score	Tissue changes	Histologic findings
0	Normal	The epithelium consists of thin pseudostratified columnar epithelium. The mucous glands are normal.
1	Minimal changes	Normal epithelium with mild to moderate infiltration of lymphocytes; heterophils rare. The mucous glands normal. No syncytia or cells with intranuclear inclusion bodies.
2	Mild changes	The mucosa thickened because of mild to moderate cell infiltration and/or epithelium essentially normal except for foci of syncytia with intra-nuclear inclusion bodies. Hyperemia, sometimes with cell cuffs.
3	Moderate changes	The mucosa thickened due to moderate to marked cell infiltration. Multiple syncytia with intranuclear inclusion bodies. Patches of damaged epithelium often separating from, or occur less commonly, detached from lamina propria. The mucosal surface well covered by normal or damaged epithelium. The mucous glands reduced. Marked hyperemia, cuffs of mononuclear cells around vessels outside the mucosa.
4	Severe changes	The mucosa thickened because of edema, protein fluid, cellular secretion, or adherent fibrinohemorrhagic to cellular pseudomembrane on the surface. Normal epithelium absent, the surface of mucosa covered by a thin layer of basal cells. Syncytia sometimes exist with inclusion bodies.
5	Very severe changes	Same as 4, except mucosa has no residual epithelium and syncytia with inclusion bodies rarely found.

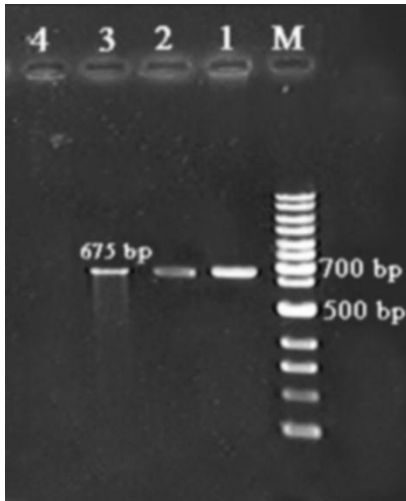
روش آنالیز کای اسکوئر استفاده شد. اختلاف‌های معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد بیان شد.

### نتایج

نتایج آزمایش‌های جداسازی، سرولوژی و مولکولی شناسایی ویروس ILT: پس از آماده‌سازی و تلقیح نمونه

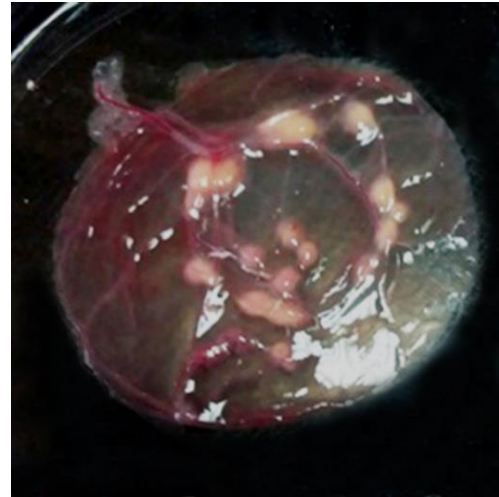
### آنالیز آماری

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص بیماری‌زایی داخل نایی و هیستوپاتولوژی ناشی از تلقیح ویروس ILT در سویه‌های LSL و Bovans با نرم‌افزار SPSS و به روش ناپارامتری با استفاده از آزمون Mann-whitney انجام شد. برای مقایسه درصد پرندگان دارای نشانه‌های بیماری، از



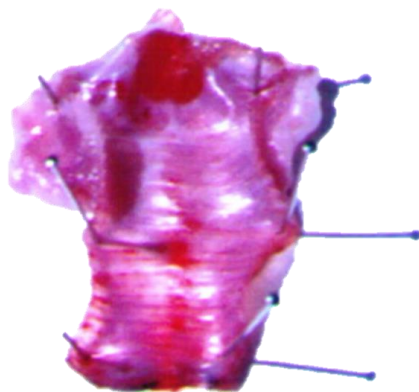
**Figure 3: Amplification of the 675 bp fragment of infectious laryngotracheitis virus thymidine kinase gene. M: DNA molecular marker, 1: Infectious laryngotracheitis virus (positive control), 2 and 3: virus isolates, 4: negative control.**

در تخم مرغ SPF جنین دار، پلاک های مشخص روی غشای کوریو آلتوتویک مشاهده شد که نشان دهنده وجود ویروس در نمونه بود (Fig. 2).



**Figure 2: Formation of typical plaques on the chorioallantoic membrane of embryonated eggs following infectious laryngotracheitis virus propagation**

نخستین نشانه های بیماری شامل تنفس با دهان باز، ایجاد خلط های خونی، تورم سینوس ها در پرندگان مورد آزمایش مشاهده شد (Fig. 4). اگر چه درصد بیش تری از پرندگان سویه Bovans نسبت به LSL تنفس با دهان باز و خلط های خونی داشتند (به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۶۰ درصد در برابر ۸۰ درصد و ۴۰ درصد)، اما تورم سینوس ها به طور نسبی در سویه ی LSL نسبت به Bovans بیش تر بود (۶۰ درصد در برابر ۴۰ درصد). با این حال، اختلاف بین دو سویه از نظر نشانه های مورد مطالعه معنی دار نبود (Fig. 5;  $P > 0.05$ ).

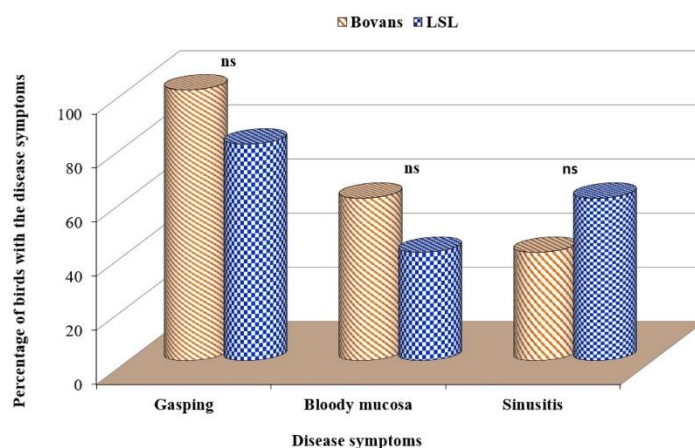


**Figure 4: Hyperemia and mucosal bleeding in the trachea of chicken caused by infectious laryngotracheitis virus**

نتایج حاصل از آزمایش ترسیب در ژل آگار با استفاده از سرم هیپرایمن اختصاصی ویروس ILT نشان داد که ویروس جدا شده، ویروس ILT بود. این آزمایش توسط نتایج حاصل از آزمون خشتی سازی ویروس نیز به تأیید رسید و در کنار نتایج آزمایش مولکولی، حضور ویروس ILT به تأیید رسید. نتایج حاصل از تکثیر ژن TK ویروس ILT در Fig. 3 نشان داده شده است. محصول PCR از نمونه های مورد آزمایش، مشابه با کنترل مثبت (سویه واکسن ویروس ILT)، طول تقریبی ۶۷۵bp داشت که با توجه به اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده و همچنین تشابه توالی های مورد آزمایش با توالی های ثبت شده ی ژن TK ویروس ILT استاندارد، حضور این ویروس به تأیید رسید. توالی ژن TK ویروس ILT طیور حاصل از این آزمایش در پایگاه داده GenBank با کد شناسایی JF838220 قابل دسترسی است.

افزایش یافت و یک مورد تلفات نیز مشاهده شد. شاخص بیماری‌زایی ویروس ILT برای نیمچه‌های سویه LSL ۰/۴۷۵ بود. در سویه Bovans، پس از ۸ روز همگی پرندگان علائم بیماری را نشان دادند و یک مورد تلفات نیز مشاهده شد. مقدار ITPI ویروس ILT برای نیمچه‌های سویه Bovans ۰/۵۳۷ بود.

نتایج مربوط به رکوردهای روزانه علائم بیماری‌زایی داخل نایی ویروس ILT شامل طبیعی، بیماری تنفسی و مرگ، طی هشت روز نخست پس از تلقیح ویروس در Table 3 و Fig. 6 & 7 گزارش شده است. بر اساس نتایج، در سویه‌ی LSL در روز سوم پس از تزریق داخل نایی ویروس ILT، تعداد دو پرنده علائم بیماری تنفسی را نشان دادند. هشت روز پس از تلقیح، این تعداد به ۶ پرنده



**Figure 5: Comparison of different infectious laryngotracheitis symptoms in Bovans and LSL pullets following intra tracheal inoculation of the virus (ns = not significant, P> 0.05)**

**Table 3: Comparison of intra-tracheal pathogenicity index of infectious laryngotracheitis virus in Bovans and LSL pullets**

Post inoculation days	Bovans				LSL			
	Normal	Sick	Dead	Total score	Normal	Sick	Dead	Total score
1	10	0	0		10	0	0	
2	10	0	0		10	0	0	
3	9	1	0		8	2	0	
4	6	4	0		5	5	0	
5	4	6	0		4	5	1	
6	1	8	1		3	6	1	
7	0	9	1		3	6	1	
8	0	9	1		3	6	1	
Total	40	37	3	80	46	30	4	80
Score	0	1	2	-	0	1	2	-
Computational sum	0	37	6	43	0	30	8	38
ITPI	43/80=0.537				38/80=0.475			

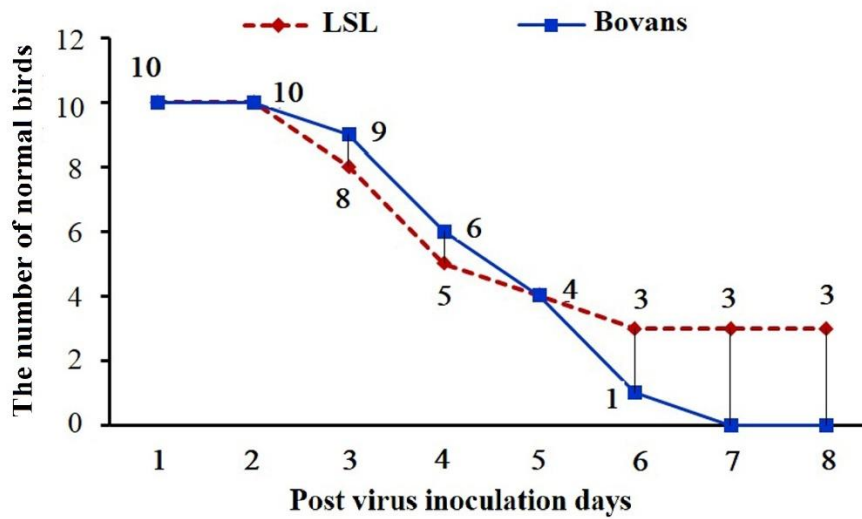


Figure 6: Comparison of the number of normal Bovans and LSL pullets following intra-tracheal inoculation of infectious laryngotracheitis virus based on intra tracheal pathogenicity index

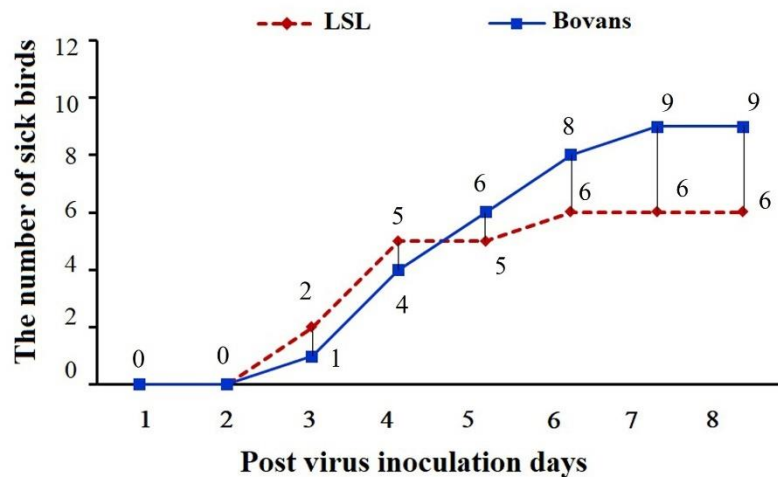
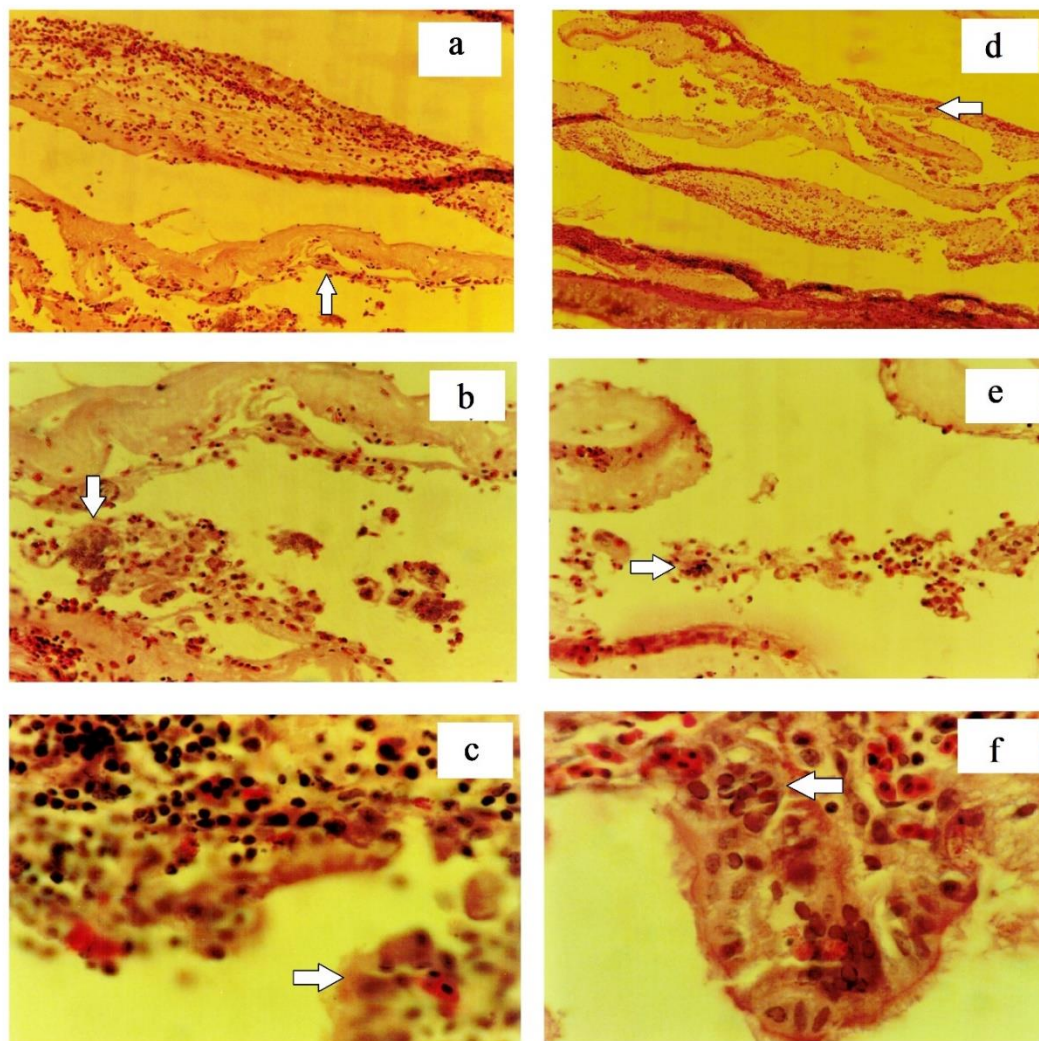


Figure 7: Comparison of the number of sick Bovans and LSL pullets following intra-tracheal inoculation of infectious laryngotracheitis virus based on intra tracheal pathogenicity index

در نیمچه‌های سویه‌ی Bovans برابر ۳/۴۵ و در نیمچه‌های سویه‌ی LSL برابر با ۳/۲۰ محاسبه شد که نشان از بالاتر بودن نسبی این شاخص در سویه‌ی Bovans نسبت به LSL داشت.

تغییرات بافت نای نیمچه‌های سویه‌ی Bovans و LSL پس از تلقیح ویروس ILT به صورت داخل نایی در Table 4 و Fig. 8 ارائه شده است. از نظر HPI بین سویه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). با این وجود، بر اساس درجه‌بندی ضایعات بافت نای، HPI





**Figure 8: Comparison of tracheal histopathology sections of Bovans (a, b, c) and LSL (d, e, f) pullets infected with infectious laryngotracheitis virus. Multinucleated giant cells (syncytium) with inclusion bodies within eosinophilic nuclei and infiltration of inflammatory cells are observed. A and d) Magnification X 100, b and e) Magnification X 400, c and g) Magnification X 1000. The white arrows indicate the multicellular giant cells.**

**Table 4: Comparison of tracheal histopathology index of LSL and Bovans pullets following inoculation of infectious laryngotracheitis virus**

Score*	Histology change	Strains	
		Bovans	LSL
0	Normal	0	0
1	Minimal	1	1
2	Mild	0	0
3	Moderate	10	14
4	Severe	7	4
5	Very severe	2	1
Total		69	64
Histopathology index		3.45	3.20

\* Scoring was carried out based on the standard of histopathology index represented in Table 2.

## بحث

در اسمیر بافتی بسیار اختصاصی است (Jordan, 1993). آزمایش‌های مولکولی بسیار حساس هستند و احتمال تشخیص موارد مثبت حتی با وجود پائین بودن مقدار ویروس در نمونه‌ها یا غیر زنده بودن آن، بیش‌تر از سایر روش‌ها است. هر چند علیرغم حساسیت و ویژگی بالای PCR، ممکن است وجود برخی اجزای بافتی و خونی تشخیص ویروس را با دشواری و یا شکست مواجه نماید (Ebrahimi et al, 2003; Garcia et al, 2013).

نتایج این پژوهش، در درجه‌ی نخست، کارایی روش مولکولی مورد استفاده برای تشخیص بیماری ILT از نمونه‌های بافتی مشکوک به بیماری را مشخص نمود. همچنین، یافته‌های حاصل از آزمایش ترسیب در ژل آگار تأییدی بر یافته‌های حاصل از آزمایش مولکولی بود، به طوری که در نمونه‌های مثبت، رسوب خطی مشاهده شد. افزون بر این، حساسیت دو نیمچه‌ی سویه‌های تخم‌گذار Bovans و LSL نسبت به ویروس ILT جدا شده از مزرعه بررسی شد. مقایسه‌ی شاخص‌های بیماری‌زایی ویروس ILT در سویه‌های مورد آزمایش نشان داد که با وجود اختلاف‌های عددی بین دو نژاد، تفاوت معنی‌داری بین شاخص‌ها وجود نداشت. با این حال، بالاتر بودن شاخص‌های بیماری‌زایی در سویه Bovans حساسیت بیش‌تر این سویه را نشان می‌دهد. هدف اصلی اصلاح نژاد مرغ‌های تخم‌گذار، افزایش بهره‌ی اقتصادی و تولید بیش‌تر تخم مرغ است. موفقیت در افزایش تولید تخم مرغ به عوامل زیادی وابسته است. انتخاب جوجه‌های تخم‌گذار برای افزایش سطح تولید در ۵۰ سال گذشته منجر به بهبود این صفت شده است، ولی اثرات نامناسبی مانند حساسیت بیش‌تر به بیماری‌ها نیز گریبان‌گیر این مرغ‌ها شده است. احتمالاً تفاوت در سویه و سن پرندگان در زمان آزمایش در بروز نتایج متفاوت در زمینه‌ی مقاومت پرندگان به بیماری نقش دارد. برای نمونه، Poulsen و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که از نظر حساسیت به بیماری ILT، سه لاین آمیخته طیور که در معرض دز یکسانی از ویروس

بیماری ILT از بیماری‌های ویروسی مجاری تنفسی ماکیان است که شکل حاد آن سبب درگیری ۱۰۰-۹۰ درصدی طیور شده و دامنه‌ی متغییری از تلفات که بین ۷۰-۵ درصد و به طور معمول بین ۲۰-۱۰ است را موجب می‌شود. در شکل خفیف‌تر بیماری نیز اغلب ۵ درصد از گله درگیر شده و بین ۲-۱ درصد تلفات به بار می‌آورد (Garcia et al, 2013). درگیری گله‌های طیور تخم‌گذار با این بیماری موجب تحمیل خسارت اقتصادی قابل توجهی به واحدهای پرورشی می‌شود. اگر چه واکنش‌های سیستم ایمنی اولیه و واکنش‌های ثانویه در این بیماری است، اما با توجه به این که واکنش این بیماری در تمام نقاط استفاده نمی‌شود، انتخاب سویه‌هایی که حساسیت کم‌تری به بیماری دارند، می‌تواند به تولید محصول سالم‌تر، کاهش هزینه‌های درمان و افزایش سودآوری گله‌های تخم‌گذار کمک نماید. در این پژوهش، دو سویه‌ی تخم‌گذار Bovans و LSL از نظر شاخص بیماری‌زایی داخل نایی و شاخص هیستوپاتولوژی نسبت به ویروس بیماری‌زای ILT مقایسه شدند.

برای تشخیص ILT و تفکیک آن از دیگر بیماری‌های تنفسی که نشانه‌های بالینی مشابهی دارند، به آزمایش‌های مختلفی نیاز است که بر پایه‌ی جداسازی ویروس، روش‌های سرولوژی، هیستوپاتولوژی و مولکولی استوار هستند (Garcia et al, 2013). جداسازی و تعیین عیار ویروس در نمونه‌های اولیه و نیز بررسی جدایه‌های جدید ویروس از مزرعه از مزایای روش حساس جداسازی است. اگر چه ترسیب در ژل آگار یک آزمایش ساده و ارزان برای تعیین ویروس است، اما وقتی مقدار ویروس در نمونه کم باشد، حساسیت زیادی ندارد. مشاهدات میکروسکوپی در مراحل مختلف بیماری ILT تغییر می‌کند. سلول‌های غول‌آسای چند هسته‌ای یا سن‌سی‌تیوم و اجسام انکلوزیونی درون هسته‌ای ائوزینوفیلیک، یافته‌های اختصاصی هستند که در مراحل اولیه‌ی عفونت مشاهده می‌شوند. تشخیص بر اساس مشاهده‌ی اجسام انکلوزیونی

همواره به عنوان اصلی‌ترین عامل مطرح بوده است، دیگر ژن‌های مربوط به سیتوکین‌ها و گیرنده‌های سلولی نیز ممکن است در به وجود آوردن مقاومت ژنتیکی به بیماری هرپسی نقش داشته باشند (Boodhoo et al, 2016). در مورد بیماری ILT، پیشنهاد شده است که پاک‌سازی پرنده از ویروس با سازوکار ایمنی با واسطه‌ی سلولی انجام می‌گیرد (Coppo et al, 2013). مشخص شده است که ماکروفاژهای پرنده‌گانی که از نظر ژنتیکی مقاومت بالاتری به ILT دارند، نسبت به پرنده‌گان حساس، آنتی‌ژن بیش‌تری تولید می‌کنند. این شواهد نشان می‌دهند که ماکروفاژهای لاین‌های خالص مقاوم، در فرآوری و ارائه آنتی‌ژن ILT کارایی بیش‌تری دارند و این موضوع، توضیحی برای تولید بالاتر تیتراژ آنتی‌بادی در لاین‌های دارای مقاومت بیش‌تر می‌باشد (Loudovaris et al, 1991). Fahey و همکاران در سال ۱۹۸۴ نشان دادند که انتقال سلول‌های ایمنی با منشاء طحال یا لنفوسیت‌های خونی، پرنده‌گان لاین خالص را در برابر چالش‌های ایجاد شده توسط ویروس بیماری‌زای ILT محافظت می‌کند.

در این پژوهش، حساسیت دو سویه‌ی نیمچه تخم‌گذار به سویه‌ی ویروس ILT جدا شده از مزرعه متفاوت نبود، اما شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سویه‌های مختلف ویروس ILT از نظر بیماری‌زایی و نشانه‌های بالینی واریانس زیادی با یکدیگر دارند و در نتیجه، این نشانه‌ها و به دنبال آن خسارات ناشی از آلودگی با سویه‌های مختلف ویروس در پرنده‌گان می‌تواند متفاوت باشد (Jordan, 1993). بنابراین، ممکن است سویه‌های Bovans و LSL از نظر آلودگی با سویه‌های مختلف ویروس، رفتار متفاوتی داشته باشند. افزون بر این، شرایط مختلف پرورش و تغذیه می‌تواند بر پاسخ ایمنی یک بیماری تأثیر بگذارد. در این راستا، Ebrahimi و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که تیتراژ آنتی‌بادی علیه واکسن ILT در طیوری که جیره‌ی آلوده شده با ۲۰۰ ppb آفلاتوکسین مصرف کردند، کاهش یافت.

قرار گرفته بودند با یکدیگر اختلاف زیادی داشتند. افزون بر این، با در معرض قرار دادن پرنده‌گان لاین‌های مختلف با ویروس ILT، نشان داده شد، دزی از ویروس واکسینال که بتواند پرنده‌گان را در برابر ویروس ایمن کند، متفاوت خواهد بود. در مطالعه‌ی دیگر، Loudovaris و همکاران ۱۹۹۱ نشان دادند لاین‌هایی که از نظر جایگاه ژنی B113 هموزیگوت بودند، نسبت به پرنده‌گان هموزیگوت B114 و B15 مقاومت بیش‌تری نسبت به ILT داشتند (Loudovaris et al, 1991). اثر ژن‌های مختلف بر بروز مقاومت و یا حساسیت نسبت به بیماری‌های طیور بررسی شده است و به نظر می‌رسد بیش از یک یا چند ژن محدود در بروز تفاوت‌های ژنتیکی بین لاین‌ها و یا سویه‌های مختلف طیور نقش داشته باشند (Lee et al, 2010; Tsai et al, 1992). در این راستا، Lee و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی تفاوت در بیان ژن‌های مختلف جنین‌های آلوده شده با ویروس ILT نسبت به گروه شاهد، نشان دادند که بیان ۷۸۹ ژن جنین‌های آلوده تغییر می‌کند. با توجه به آرایش متفاوت این ژن‌ها در لاین‌ها و سویه‌های مختلف طیور، میزان مقاومت به بیماری می‌تواند از یک گروه ژنتیکی به گروه دیگر تفاوت‌های زیادی داشته باشد؛ بنابراین، این موضوع می‌تواند دلیلی بر متفاوت بودن نتایج آزمایش‌هایی با ماهیت و طراحی یکسان در گروه‌های ژنتیکی مختلف باشد.

مقاومت به بیماری و سازوکار درگیر در بروز آن، به تغییرات ایمنی و تکامل سیستم ایمنی نیز بستگی دارد (Wijga et al, 2009). شماری از محققین، درجه‌ی مقاومت و حساسیت جوجه‌ها به عوامل بیماری‌زایی ویروسی مانند لکوز لنفوئید، بیماری مارک و نیوکاسل را به تفاوت در ژن‌های MHC ارتباط می‌دهند، اما مطالعات دیگری وجود دارند که نشان می‌دهند لاین‌هایی که از نظر ژن‌های MHC هموزیگوت بودند، در برابر بیماری‌های عفونی مقاومت بیش‌تری داشتند و پس از واکسیناسیون نیز ایمنی بالاتری را دارا بودند. اگر چه نقش ژن‌های MHC و تفاوت‌های نژادی این ژن در بروز حساسیت به بیماری‌ها

شده است که افت تولید در مرغداری‌های تخم‌گذار سویه-های Bovans و LSL در زمان ابتلا به بیماری نسبت به سویه‌های مانند های‌لاین W36 بیش‌تر است که خود نشان از تفاوت‌های نژادی در مقاومت به بیماری‌ها دارد (Bovans White Product Guide, 2009; Lohmann) (LSL Classic Layers Management Guide, 2013).

مطالعه‌ی شاخص‌های بیماری‌زایی داخل نایی و هیستوپاتولوژی در پژوهش کنونی نشان از مقاومت نسبتاً بیش‌تر و جراحات بافتی کم‌تر سویه‌ی LSL نسبت به Bovans داشت. اگر چه این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی-دار نبود، اما ممکن است در شرایط کاربردی، افت تولید حاصل از این تفاوت نسبی، چشم‌گیر باشد. لذا برای نتیجه‌گیری با قطعیت بالاتر، باید پژوهش‌های بیش‌تری در سطح وسیع‌تر، و با در نظر گرفتن سایر شاخص‌های تولیدی انجام شود.

پژوهش‌های محدودی برای محاسبه‌ی وراثت‌پذیری و همبستگی ژنتیکی مقاومت به بیماری با سایر صفات مهم انجام شده است (Fedde, 1998). با توجه به این که لاین و سویه‌های مختلف تجاری، برای شرایط پرورشی در تمام دنیا و با شرایط متفاوت نمی‌تواند کارآیی یکسانی داشته باشد و همچنین شیوع آلودگی‌های ویروسی و سویه‌ی ویروس‌های موجود در مناطق مختلف، متفاوت است، باید به موضوع انتخاب سویه‌های مقاوم‌تر به بیماری‌های شایع به طور جدی‌تری پرداخته شود. حساسیت کم‌تر مرغ‌های تخم‌گذار امروزی به بیماری‌های مارک و یا لوکوز لنفوئید، نتیجه‌ی توجه به صفت مقاومت به این بیماری‌ها در شاخص انتخاب این سویه‌های تجاری در گذشته است (Alexander and Nagy, 1997). بررسی سویه‌های Bovans و LSL نشان داده است که هر دو این سویه بسیار پر تولید هستند، هر چند که سویه‌ی Bovans عملکرد به نسبت بهتری دارد. با این حال، به طور تجربی مشخص

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مدیریت و پرسنل بخش تحقیق و تولید واکسن‌های ویروسی طیور مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به خاطر حمایت در انجام این تحقیق اعلام می‌نمایند.

## تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

## منابع مالی

منابع مالی این تحقیق از پروژه با شماره ۰۱-۱۱۷۰۰۰-۰۴۳۰۷۸ توسط مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین شده است.

## منابع

- Alexander, H. S., & Nagy, E. (1997). Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian diseases* 41(3): 646-653.
- Boodhoo, N., Gurung, A., Sharif, S., & Behboudi, S. (2016). Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. *Veterinary Research* 47(1): 119.
- Coppo, M. J., Hartley, C. A., & Devlin, J. M. (2013). Immune responses to infectious laryngotracheitis virus. *Developmental and Comparative Immunology* 41(3): 454-462.

- Ebrahimi, M., Pourbakhsh, S., Shahsavandi, S., Momayez, R., & Gholami, M. (2003). Isolation and identification of infectious laryngotracheitis virus from commercial flocks of Iran using various techniques. *Archives of Razi Institute* 56(1): 11-22.
- Ebrahimi, M., Shahsavandi, S., & Gholami, M. (2001). Outbreak of infectious laryngotracheitis following vaccination in pullet flock. *Archives of Razi Institute* 52(1): 19-26.
- Ebrahimi, M. M., & Shahsavandi, S. (2008). Evaluation of antibody levels during simultaneous aflatoxicosis and vaccination against infectious laryngotracheitis in pullets. *Biologicals* 36(5): 327-329.
- Fahey, K., York, J., & Bagust, T. (1984). Laryngotracheitis herpesvirus infection in the chicken. II. The adoptive transfer of resistance with immune spleen cells. *Avian Pathology* 13(2): 265-275.
- Fedde, M. (1998). Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science* 77(8): 1130-1138.
- Garcia, M., Spatz, S., & Guy, J. S. (2013). Infectious laryngotracheitis. In: D. E. Swayne, *Diseases of poultry* (13<sup>th</sup> ed., pp: 161-179). New Jersey, US: John Wiley & Sons.
- Guy, J.S., Barnes, H.J., & Morgan, L.M. (1990). Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Diseases* 34(1): 106-113.
- Guy, J. S., Barnes, H. J., & Smith, L. (1991). Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian diseases* 35(2): 348-355.
- Jordan, F. T. W. (1993). Infectious laryngotracheitis. In: J. B. McFerran, & M.S. McNulty, *Virus Infection of Bird* (1<sup>st</sup> edn., pp. 19-35). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V.
- Jovanovic, S., Savic, M., & Zivkovic, D. (2009). Genetic variation in disease resistance among farm animals. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25(5): 339-347.
- Lee, J. Y., Song, J. J., Wooming, A., Li, X., Zhou, H., Bottje, W. G., et al. (2010). Transcriptional profiling of host gene expression in chicken embryo lung cells infected with laryngotracheitis virus. *BMC Genomics* 11(1): 1-15.
- Loudovaris, T., Yoo, B., & Fahey, K. (1991). Genetic resistance to infectious laryngotracheitis in inbred lines of White Leghorn chickens. *Avian Pathology* 20(2): 357-361.
- Oldoni, I., Rodriguez-Avila, A., Riblet, S.M., Zavala, G., & Garcia, M. (2009). Pathogenicity and growth characteristics of selected infectious laryngotracheitis virus strains from the United States. *Avian Pathology* 38(1): 47-53.
- Ou, S. C., & Giambrone, J. J. (2012). Infectious laryngotracheitis virus in chickens. *World Journal of Virology* 1(5): 142-149.
- Poulsen, D.J., Thureen, D.R., & Keeler Jr, C.L. (1998). Comparison of disease susceptibility and resistance in three lines of chickens experimentally infected with infectious laryngotracheitis virus. *Poultry Science* 77(1): 17-21.
- Shahsavandi, S., Jamshidi-Navroud, Z., Firouzi, M., & Ebrahimi, M. M. (2017). Examining responses of chicken embryonic neural stem cell to infectious laryngotracheitis virus infections. *Comparative Clinical Pathology* 26(2): 493-498.
- Stear, M., Bishop, S., Mallard, B., & Raadsma, H. (2001). The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Research in Veterinary Science* 71(1): 1-7.
- Swayne, D. E. (2008). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens (4th ed). International Book distributing Co. in association American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, US. Pp: 94-98.
- Tsai, H., Saif, Y., Nestor, K., Emmerson, D., & Patterson, R. (1992). Genetic variation in resistance of turkeys to experimental infection with Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 36(3): 561-565.
- Van Dorp, T., Dekkers, J., Martin, S., & Noordhuizen, J. (1998). Genetic parameters of health disorders, and relationships with 305-day milk yield and conformation traits of registered Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 81(8): 2264-2270.
- Wijga, S., Parmentier, H. K., Nieuwland, M. G. B., & Bovenhuis, H. (2009). Genetic parameters for levels of natural antibodies in chicken lines divergently selected for specific antibody response. *Poultry Science* 88(9): 1805-1810.

## Comparison of infectious laryngotracheitis virus pathogenesis in Bovans White and LSL strains pullets by intratracheal pathogenicity and histopathology indices methods

Mohammad Majid Ebrahimi<sup>1\*</sup>, Mohammad Saber Saba<sup>2</sup>, Shahla Shahsavandi<sup>3</sup>,  
Ali Reza Yousefi<sup>1</sup> and Mohammad Hasan Hablolvarid<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

<sup>2</sup> Expert, Seamorgh Farm, Buein Zahra, Qazvin, Iran

<sup>3</sup> Associated Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Received: 12.03.2019

Accepted: 17.08.2019

### Abstract

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a highly contagious viral respiratory disease of chickens. The objective of this study was to evaluate the pathogenicity indices of ILT virus in Bovans White and Lohmann Selected Leghorn (LSL) strains. Following isolation, identification and confirming the virus through molecular and serological tests, the viral titer was calculated by Spearman-kärber method. The ILT virus ( $> 10^3$  EID<sub>50</sub>) was inoculated to thirty 8-week-old pullets of each strain via the intratracheal route. The birds were observed for the clinical signs of ILT up to eight days. There was no significant difference regarding clinical signs, intratracheal pathogenicity index (ITPI) and histopathology index (HPI) between Bovans and LSL strains, respectively. The results of this study indicated that the ILT virus had relatively similar pathogenicity in both strains, however, Bovans strain may be seen as more sensitive to ILTV than LSL strain due to the higher ITPI and HPI.

**Key words:** Infectious laryngotracheitis, Layer chicken, Pathogenicity index, Histopathology

---

\* **Corresponding Author:** Mohammad Majid Ebrahimi, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran, E-mail: mm.ebrahimi@rvsri.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).