

## شناسائی مولکولی ویروس بیماری گامبورو در گله‌های گوشتی با علائم کلینیکی حاد در استان گیلان

• یداله اسدپور (نویسنده مسئول)

بخش دامپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان،  
رشت، ایران

• ابراهیم رحیم آبادی

بخش دامپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان،  
رشت، ایران

• عبدالحمید شوشتری

بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه واکسن و

سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۳-۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۷-۰۳

Emali: yasadpour@yahoo.com



### چکیده

بیماری بورس عفونی یا گامبورو یک بیماری حاد و فوق العاده مسری است و ویروس آن پاتوژن مهم تضعیف‌کننده سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی و تخم‌گذار در سراسر دنیا است. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی سویه‌های درگیر در موارد کلینیکی بیماری گامبورو در طیور گوشتی استان گیلان بوده است. بر اساس علائم کلینیکی و یافته‌های کالبدگشائی تعداد چهار گله (۱۰ درصد) از ۴۰ گله‌ی تحت بررسی مشکوک به بیماری تشخیص داده شد. در نمونه‌های بورس فابریسیوس هر چهار گله پس از استخراج RNA و انجام آزمایش RT-PCR، یک باند ۶۴۳ جفت باز در ناحیه بسیار متغیر ژن VP۲ تکثیر شد. برای تایید بیشتر RT-PCR هر چهار گله، آزمایش PCR آشیانه‌ای انجام شد که با استفاده از پرایمر اختصاصی یک باند ۵۵۲ جفت باز تکثیر و مشاهده شد. برای شناخت حدت ویروس، آزمایش هضم آنزیمی با دو آنزیم *SacI* و *BspMI* صورت گرفت و نتایج هضم ثبت گردید. بر اساس نتایج به دست آمده هر چهار گله مبتلا به ویروس فوق حاد بیماری گامبورو و IBD تشخیص داده شد. نتیجه اینکه در چندسال اخیر علی‌رغم کاهش موارد حاد کلینیکی بیماری گامبورو، سویه فوق حاد در گله‌های گوشتی استان گیلان در حال چرخش بوده و مطالعه بعدی شناسائی تحت کلینیکی بیماری گامبورو در سنین پائین توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: گامبورو، Nested-PCR، RT-PCR، هضم آنزیمی، طیور گوشتی

- Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 63-70

### Molecular Detection of Gumboro Disease Virus in Broiler Flocks with Acute Clinical Signs in Guilan Province

By: Asadpour, Y., (Corresponding Author) Department of Veterinary, Agricultural Research, Education and Natural Resources Center, Guilan, Iran. Rahimabadi, E., Department of Veterinary, Agricultural Research, Education and Natural Resources Center, Guilan, Iran. and Shooshtari, A., Department of Research and Diagnosis of Poultry Disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Received: 2016-06-01 Accepted: 2016-09-24

Email: yasadpour@yahoo.com

Infectious bursal disease virus (IBDV/GD) is an acute, highly contagious viral disease and important immunosuppressive pathogen of chickens and pullets worldwide. The aim of this research was the molecular detection of Gumboro strains in clinical cases of broiler chickens in Guilan province. On the basis of clinical signs and postmortem findings, 4 flocks (10%) out of 40 flocks were suspected to Gumboro disease. RNA was extracted from fabricious bursal samples of 4 flocks and RT-PCR was performed. IBDV was detected in every 4 flock samples as evidenced by amplification of 643 bp fragment of the very variable region of VP2 gene. The authenticity of the amplicons was further confirmed by Nested-PCR generating 552-bp amplicons using specific primers. To distinguish the viral virulence, PCR products of positive samples were digested with two restriction enzymes (*SacI* and *BspMI*) and results were recorded. Results showed that vvIBD was detected in all 4 flock bursal samples. In conclusion, in spite of reduction in incidence rate of Gumboro clinical signs in recent years, passage of vvIBD virus in chicken flocks are observed. Future study on subclinical Gumboro diseases detection in early age of broiler flocks are recommended.

Key words: IBDV/GD, RT-PCR, Nested-PCR, RFLP, Broiler

کشت سلول، آزمایش رسوب در ژل آگار (AGPT)، آزمایش خنثی‌سازی سرم و یا ویروس (VN و SN)، ایمونوفلورسانس مستقیم و غیرمستقیم و روش مولکولی استفاده می‌شود. روش مولکولی نسبت به سایر روش‌ها از حساسیت بیشتری برخوردار بوده و سایر روش‌ها برای تشخیص بسیار وقت‌گیر می‌باشند ماکادیا در سال ۲۰۰۴ با بررسی بر روی پنج فارم و اخذ ۳۰ نمونه بروس از گله‌های درگیر به روش سرولوژی و مقایسه آن‌ها با روش مولکولی RT-PCR نشان داد که نتیجه آزمایش مولکولی بسته به نوع آزمایش سرولوژی ۳۰-۱۵ درصد بهتر بوده است (۷). تکثیر قطعات ژنتیکی یک ویروس ناشناخته به کمک پراپرهای اختصاصی و با روش PCR می‌تواند هویت ویروس را مشخص سازد چون جهت تکثیر قطعات ژنومی ویروس‌های دارای RNA باید یک نسخه برداری معکوس یعنی از RNA به DNA صورت گیرد. تکثیر این قطعات را به اختصار RT-PCR گویند. روش مولکولی RT-PCR و آنالیز مولکولی آن با RFLP با استفاده از آنزیم‌های اندونوکلاز محدودکننده (RE) برای ردیابی ویروس بیماری گامبورو و تعیین حدت ویروس در نمونه‌های کلینیکی به عنوان روشی بسیار دقیق و سریع استفاده شده است (۹). از آنجایی‌که یکی از راه‌های پیشگیری از بیماری گامبورو، استفاده از واکسیناسیون بوده اما علی‌رغم استفاده از واکسن‌های زنده سویه کلاسیک از نوع اینترمدیت، شاهد درگیری گله‌های گوشتی استان به شکل کلینیکی بوده‌ایم و در واقع این

#### مقدمه

بیماری عفونی بروس (گامبورو) یک بیماری حاد و بسیار واگیردار طیور بوده و به علت تلفات برخی سویه‌های ویروس در جوجه‌های بالای سن سه هفتگی که تا بیش از ۲۰ درصد گزارش شده، دارای اهمیت اقتصادی می‌باشد و همچنین در جوجه‌هایی با سنین پائین‌تر، موجب تضعیف سیستم ایمنی به مدت طولانی شده و صدمات اقتصادی آن بیشتر به دنبال عواقبی نظیر عدم پاسخ مناسب سیستم ایمنی به برنامه‌های واکسیناسیون و بروز بیماری‌های مختلف می‌باشد (۳). ویروس گامبورو از خانواده بیرناویریده و یکی از اعضای جنس بیرناویروس می‌باشد. ژنوم آن از دو قطعه RNA دو رشته‌ای تشکیل شده، قطعه بزرگ ژنوم به نام قطعه A دارای ۳۴۰۰ جفت باز و قطعه کوچک آن به نام B دارای ۲۹۰۰ جفت باز است. قطعه B حاوی کد لازم برای ساخت پلی‌پپتید VP<sub>۱</sub> بوده در حالی‌که قطعه A چهار پلی‌پپتید، VP<sub>۲</sub>، VP<sub>۳</sub>، VP<sub>۴</sub> و VPX را کد می‌نماید. ویروس گامبورو دو سروتیپ داشته که از نظر ریخت‌شناسی و اندازه یکسان و همچنین دارای آنتی‌ژن مشترک می‌باشند. سروتیپ یک برای ماکیان بیماری‌زا است اما در بوقلمون می‌تواند سبب آلودگی شده و آنتی‌بادی ایجاد نماید. سروتیپ دو ابتدا از بوقلمون جدا شده که برای ماکیان و بوقلمون غیربیماری‌زا می‌باشد (۳، ۹). به منظور تشخیص بیماری گامبورو از روش‌های مختلفی مانند جداسازی ویروس در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار و

از هرکدام از پرایمرها، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم TaqDNA پلی مراز، دو میکرولیتر بافر PCR و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با تنظیم برنامه حرارتی و زمانی واسرشت شدن ابتدایی ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه (یک چرخه)، ۳۵ چرخه اصلی واسرشت، اتصال و ساخت به ترتیب در درجه حرارت ۹۴، ۵۱، ۷۲ درجه سانتی‌گراد و هرکدام به مدت یک دقیقه و در آخر بسط انتهایی ۷۲ درجه در ۱۰ دقیقه (یک چرخه) انجام شد. در انتها محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، نتایج آن با استفاده از تابش اشعه UV به ژل ذخیره شد.

### روش

#### Nested-PCR (PCR آشیانه‌ای)

برای تأیید بیشتر PCR از روش PCR آشیانه‌ای استفاده شد و برای این منظور از تکثیر اولیه (۶۴۳ جفت باز) به نسبت ۱:۱۰ رقیق‌سازی و از پرایمرهای طراحی شده Forward 5'-CGCTATAGCGCTTGACCCAAAAA-3' (موقعیت نوکلئوتید ۶۷۳-۶۵۱) و Reverse 5'-CTACCCAGCGACCGTAACGACG-3' (موقعیت نوکلئوتید ۱۲۰۲-۱۱۷۹) (۵) استفاده شد. مقادیر و مواد واکنش و برنامه سیکل حرارتی به جز در مرحله اتصال که ۶۲ درجه سانتی‌گراد بود، مشابه قبل بود.

### روش

#### RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism)

به منظور بررسی حدت نمونه‌های فیلد از دو آنزیم محدودکننده *SacI* و *BspMI* به طور جداگانه استفاده شد. آزمایش هضم شامل سه میکرولیتر بافر  $X10$ ، یک میکروگرم از محصول PCR، دو واحد آنزیم و به مقدار لازم آب مقطر بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه شد. سپس محصول نهایی در ژل آگارز دو درصد در الکتروفورز رویت شد. از واکنش اینترمدیت  $D_{78}$  و  $Bursinr$  به عنوان سویه واکسینال و از  $IR_{۴۹۹}$  به عنوان سویه فوق حد ایرانی استفاده شد.

### نتایج

از تعداد ۴۰ گله‌ی تحت بررسی که از نظر علائم کلینیکی و کالبدگشایی، بیماری گامبورو در چهار گله (۱۰ درصد) (جدول ۱) تشخیص داده شد. در تلقیح نمونه‌های بورس به پرده کوریوآلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار، تلفات جنینی مشاهده شد. ضایعات ایجاد شده شامل پرخونی و ادماتوز بودن جنین، پرخونی و افزایش ضخامت پرده کوریوآلانتوئیک و آثار نکروز بر روی کبد بود. در روش RT-PCR چهار نمونه کلینیکی، یک باند ۶۴۳ جفت باز در ناحیه بسیار متغیر ژن  $VP_2$  (شکل ۱) و در روش PCR آشیانه‌ای یک باند ۵۵۲ جفت باز تکثیر و مشاهده شد (شکل ۲). روش هضم آنزیمی نیز نشان‌دهنده عدم هضم آنزیم *SacI* بر چهار نمونه کلینیکی و تشخیص سویه حاد (+  $vv$ ) (شکل ۳) و هضم آنزیم *BspMI* بر چهار نمونه کلینیکی و تشخیص سویه فوق حاد (+  $vv$  IBD) (شکل ۴) بود.

مطالعه سعی نموده تا ضمن تأیید تشخیص فرم کلینیکی بیماری گامبورو با روش مولکولی، حدت سویه‌های درگیر را شناسایی نماید.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری

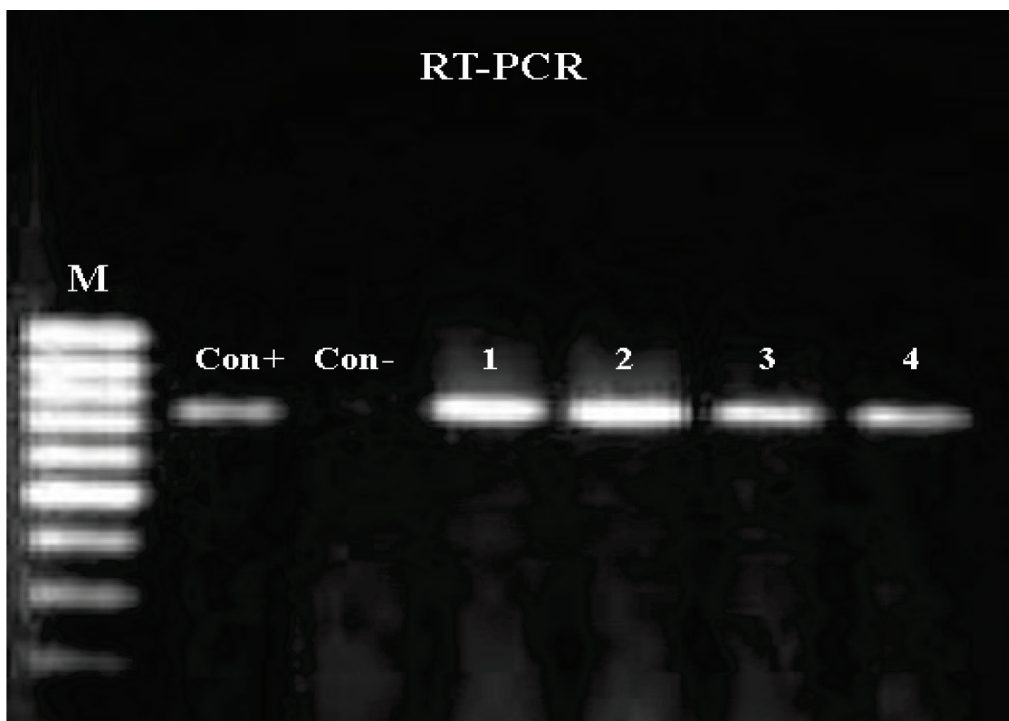
در طول این مطالعه توصیفی از پنج درصد مرغداری‌های استان، تعداد ۴۰ مرغداری تحت بررسی قرار گرفت و از گله‌هایی با افزایش منحنی تلفات سه تا پنج روزه و با مشاهده علائم کالبدگشایی در ۱۰ مرغ تلف شده از نظر پتشی و اکیموز در عضلات سینه و ران، حداقل بین پیش‌معد و سنگدان و از همه مهم‌تر وضعیت تورم بورس و ترشحات اکسودایی و پتشی، به بیماری گامبورو مشکوک شده و نمونه‌گیری انجام شد. پنج بورس فابریسیوس جدا و در یک لوله فالکون جمع‌آوری و نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (برای شناسایی آلودگی گله، پنج بورس به عنوان یک نمونه در آزمایش محاسبه شد). میزان تلفات گله‌ها چهار تا ۱۰ درصد و واکنش مصرفی از سویه اینترمدیت بود که در روزهای ۱۴ و ۲۸ به صورت آشامیدنی استفاده شده بود. مراحل زیر جهت شناسایی ویروس انجام شد.

#### تزریق به تخم‌مرغ جنین‌دار SPF

از نمونه‌های بورس فابریسیوس با استفاده از سالین بافر فسفات (PBS) سوسپانسیون ۲۰ درصد تهیه شد و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر و دی‌هیدرواسترپتومایسین ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به آن اضافه شد. سپس بعد از سه بار انجماد و ذوب، سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه انجام شد و مایع‌رویی حاصل برداشت گردید. مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از مایع‌رویی به تعداد پنج تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ تا ۱۱ روزه SPF بعد از علامت‌گذاری محل تزریق و ضدعفونی کردن آن با محلول تنطوید و الکل ۷۰ درصد، بر روی پرده کوریوآلانتوئیک تلقیح شد. از مایع هموزنیزه نمونه‌های کلینیکی بورس جهت استخراج RNA استفاده شد.

#### استخراج RNA

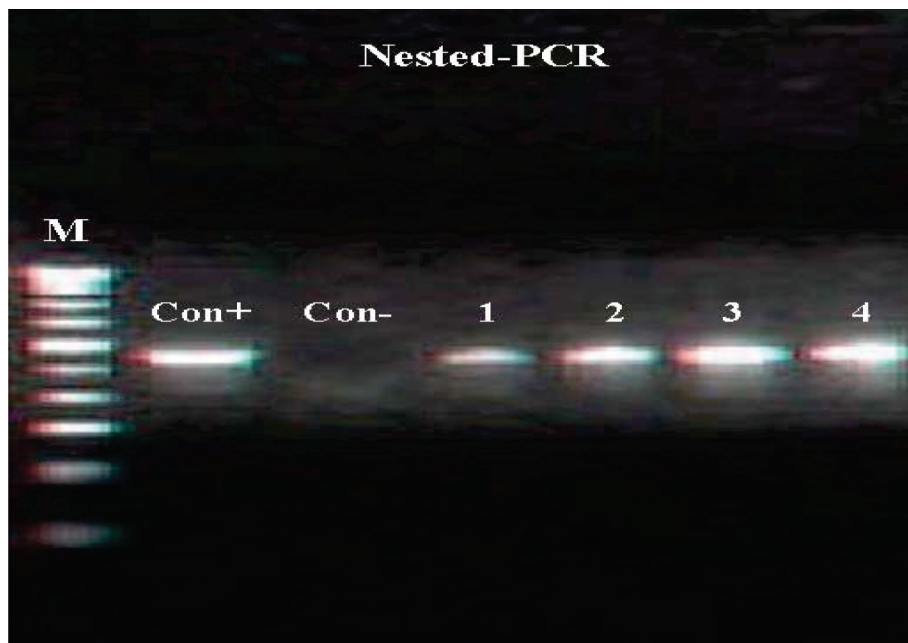
بر اساس دستور سازنده کیت High (Roche-Germany) Pure Vired Neucleic Acid Kit مراحل استخراج RNA انجام شد. واکنش RT جهت ساخت رشته cDNA از RNA در حجم ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت. در این روش پنج میکرولیتر RNA استخراج شده، یک میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای اختصاصی Forward 5'-TCACCGTCCTCAGTCCTCAGTTAC-3' (با موقعیت نوکلئوتیدی ۵۸۷-۶۰۴) و Reverse ۲-TCAGGATTTGGGATCAGC-۵' (با موقعیت نوکلئوتیدی ۱۲۲۹-۱۲۱۲) (۶)، دو میکرولیتر dNTPs، یک میکرولیتر آنزیم RT (M-MuLV) شرکت سیناژن، چهار میکرولیتر بافر RT و شش میکرولیتر آب مقطر با اجرای برنامه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام شد. سپس آزمایش PCR برای تولید قطعه ۶۴۳ جفت باز که در ناحیه بسیار متغیر ژن  $VP_2$  قرار داشت، در یک واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل چهار میکرولیتر از cDNA، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، یک میکرولیتر



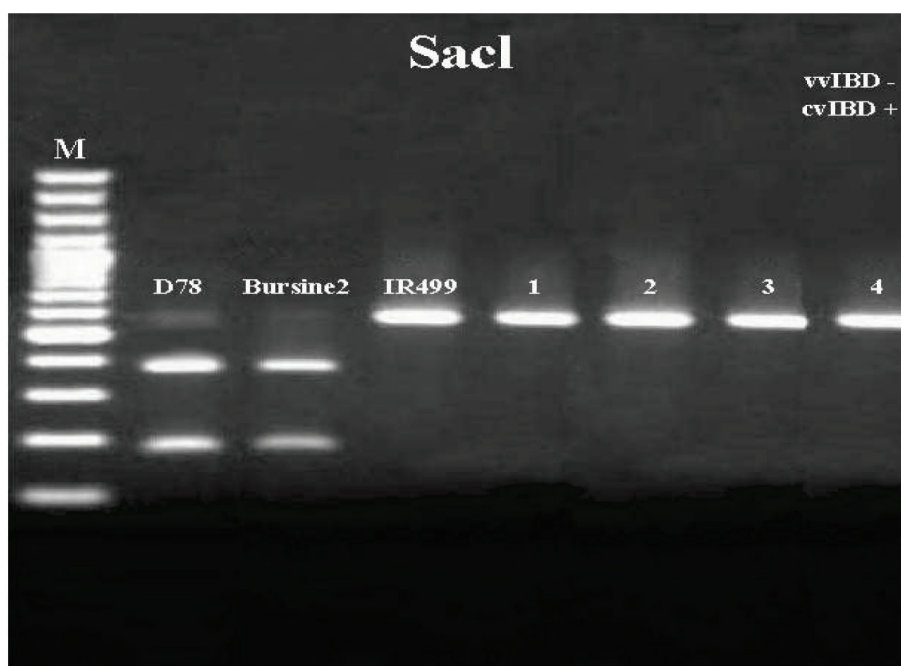
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز یک درصد، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، Con<sup>+</sup>: کنترل مثبت، Con<sup>-</sup>: کنترل منفی، ۱-۴: نمونه های کلینیکی مثبت با تشکیل باند ۶۴۳ جفت بازی.

جدول ۱- مشخصات وضعیت گله های گوشتی تحت بررسی و مشکوک به بیماری گامبورو

گله	شهرستان	ظرفیت	سن (روز)	تلفات (درصد)
F۱	صومعه سرا	۲۰۰۰۰	۲۷	۵
F۲	صومعه سرا	۱۰۰۰۰	۳۵	۹/۶
F۳	رشت	۱۵۰۰۰	۲۲	۴/۲
F۴	فومن	۱۵۰۰۰	۳۰	۴



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR آشیانه‌ای در ژل آگارز یک درصد، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، Con<sup>+</sup>: کنترل مثبت، Con<sup>-</sup>: کنترل منفی، ۱-۴: نمونه‌های کلینیکی مثبت با تشکیل باند ۲۵۵ جفت بازی.



شکل ۳- هضم محصول PCR در ژل آگارز دو درصد با آنزیم *Sacl*، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، D78: سویه کلون شده اینترمدیت، Bursine2 سویه غیرکلون اینترمدیت، IR499: سویه فوق حاد ایرانی، ۱-۴: نمونه‌های کلینیکی مثبت.



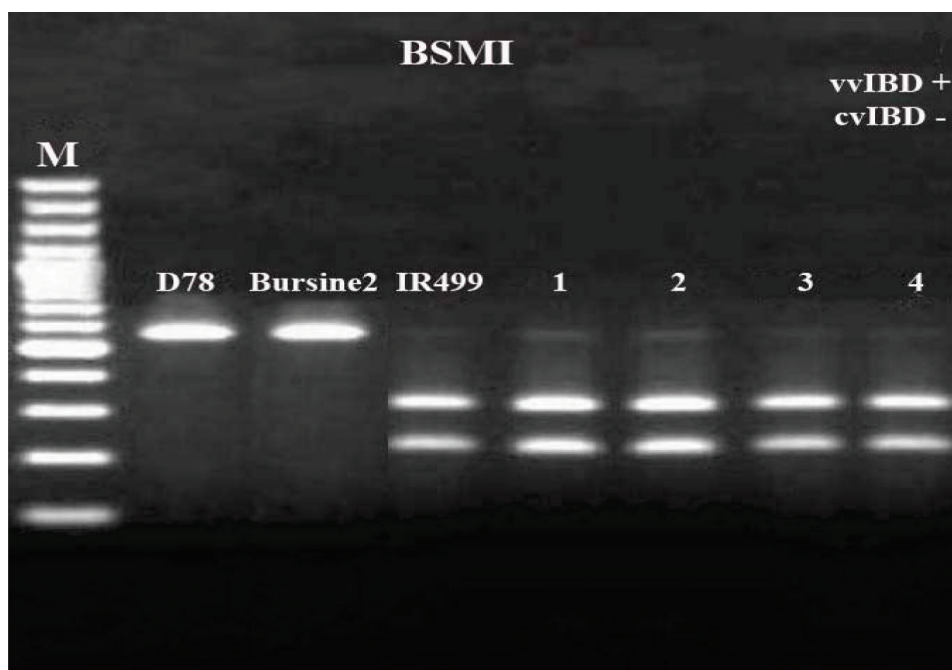
## بحث

از ناحیه متغیر ژن VP2 از نوکلئوتیدهای ۱۴۴۴-۷۰۱ تکثیر شد. از ۲۳۷ نمونه آزمایش شده، تعداد ۱۰۳ نمونه (۴۳/۴۵ درصد) از نظر ژنوم ویروس بیماری گامبورو مثبت تشخیص داده شد. درصد نتایج مثبت در تمام سنین بدون در نظر گرفتن پرندگان واکسینه شده و غیرواکسینه به ترتیب ۲۶/۵۳ درصد در سنین صفر تا سه هفتگی، ۵۶/۳ درصد در سه تا شش هفتگی و ۳۳/۳۴ درصد در شش تا هشت هفتگی بود. نتایج نشان‌دهنده شیوع بیماری گامبورو در گله‌های واکسینه ۴۷/۹۱ درصد و در گله‌های واکسینه نشده ۳۵/۵ درصد بوده است (۱۴).

رمزی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در اسماعیلیه مصر نمونه‌های بوس ۲۰ فارم گوشتی دارای عملکرد پائین و با علائم کلینیکی و کالبدگشایی را با روش RT-PCR بررسی کردند. در این روش یک باند ۶۲۰ جفت بازی در سه فارم (۱۵ درصد) از ۲۰ فارم تکثیر شد. نمونه‌های مثبت برای آنالیز توالی نوکلئوتیدی (۲۶۵ نوکلئوتید در ناحیه بسیار متغیر ژن VP2) بررسی شد. آنالیز و بلاست توالی اسید آمینه و نوکلئوتید نشان داد که جدایه‌های اسماعیلیه مصر ارتباط نزدیکی با جدایه‌های قبلی ویروس گامبورو داشته است و تقریباً ۹۹ درصد آن‌ها در یک خوشه (کلاستر) بوده‌اند. در صورتی که سویه‌های واکسن کلاسیک تخفیف حدت یافته (بوسین و بوساواک) در گروه دیگری به ترتیب ۹۲/۴۵ درصد و ۹۱/۳۲ درصد تشخیص داده شد

در مطالعه حاضر از تعداد ۴۰ گله تحت بررسی، در چهار گله (۱۰ درصد) علائم حاد کلینیکی بیماری گامبورو مشاهده شد و با تکثیر باند ۶۴۳ جفت بازی در آزمایش مولکولی RT-PCR و تکثیر باند ۵۵۲ جفت بازی در روش PCR آشیانه‌ای، شناسایی بیماری گامبورو در نمونه‌های بوس هر چهار گله تایید شد. (جدول ۱، شکل ۱ و ۲). میتال و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ایالت هاریانا کشور هندوستان از ۱۰۱ گله گوشتی با علائم کلینیکی و یافته‌های کالبدگشایی مشکوک به بیماری گامبورو، نمونه‌های بوس ۲۰ گله را به‌طور تصادفی برای تشخیص ویروس بوس عفونی به روش RT-PCR جمع‌آوری نمودند که در ۱۷ نمونه، یک باند ۶۴۳ جفت باز و در PCR آشیانه‌ای، تکثیر باند ۵۵۲ جفت باز مشاهده شد. نتایج نشان داد که روش مولکولی RT-PCR و متعاقب آن PCR آشیانه‌ای به علت سرعت، دقت و حساسیت، می‌تواند بدون استفاده از جداسازی و تلقیح در کشت سلول و یا تخم‌مرغ جنین‌دار برای تشخیص بیماری گامبورو مورد استفاده قرار گیرد (۸).

ظهور و همکاران در سال ۲۰۱۰ در پاکستان نمونه‌های بوس گله‌های گوشتی واکسینه شده و غیرواکسینه دارای علائم کلینیکی به بیماری گامبورو را با روش مولکولی بررسی نمودند. یک قطعه ۷۴۳ جفت باز



شکل ۳- هم‌مجموع محصول PCR در ژل آگارز دو درصد با آنزیم SacI، M: مارکر ۰۰۱ جفت بازی، D78: سویه کلون شده اینترمدیت، Bursine2 سویه غیرکلون اینترمدیت، IR499: سویه فوق حد ایرانی، ۱-۴: نمونه‌های کلینیکی.

توانست برش ایجاد کند و در سویه‌های فوق حد بی‌تاثیر بود و در عوض آنزیم BspMI بر روی سویه‌های فوق حد برش آنزیمی ایجاد نموده و بر روی سویه‌های کلاسیک نتوانست هضم آنزیمی ایجاد نماید (۱۵). تعدادی از محققین از شناسایی و آنالیز توالی نوکلئوتیدی و فیلوژنیک استفاده نموده و حدت ویروس و خاستگاه آن را تعیین نمودند که موارد بالینی بیماری بیشتر از نوع فوق حد بوده است. طرفی و همکاران در خراسان جنوبی تعداد ۱۰ ویروس بیماری گامبورو تأیید شده با روش مولکولی را تعیین توالی نمودند. آنالیز توالی اسیدهای آمینه ترجمه شده در ناحیه بسیار متغیر ژن VP۲ این ویروس‌ها نشان داد که اسیدهای آمینه در موقعیت ۲۲۲ (A)، ۲۵۶ (I)، ۲۹۴ (I)، ۲۹۹ (S) و همچنین هپتاپپتید غنی از سرین SWASASGS در نه ویروس شناسائی شد. از این میان هفت ویروس کاملاً شبیه یکدیگر و شبیه ویروس بسیار حد گامبورو گزارش شده از اروپا، آسیا و ایران بود. دو ویروس دیگر به ترتیب با یک و سه اسید آمینه متفاوت از سایر ویروس‌های بسیار حد بودند. تغییر اسیدهای آمینه کلیدی موقعیت ۲۴۲ (I به N) و ۲۷۹ (D به N) برای اولین بار در ویروس‌های بسیار حد ایرانی در یک ویروس شناسایی شد. اسیدهای آمینه ویروس دیگر شبیه به ویروس‌های کلاسیک با حدت کم بود اما به هیچیک از ویروس‌های واکسن بیماری گامبورو شبیه نبود. آنالیز فیلوژنیک نشان داد که خاستگاه ویروس‌های بسیار حد مورد مطالعه با خاستگاه ویروس‌های بسیار حد بیماری گامبورو در اروپا و آسیا یکسان بوده است (۱۳). در مطالعه‌ی آمین و جک وود در سال ۲۰۱۴ در اقلیم خودمختار کردستان عراق، با شناسائی ۱۰ نمونه از ۲۹ نمونه بورس فابریسیوس طیور گوشتی در RT-PCR و آنالیز مولکولی توالی نوکلئوتیدی، پنج ویروس گامبورو به عنوان ویروس خیلی حد (vVIBD)، دو نمونه به عنوان ویروس واکسن کلاسیک و سه نمونه دیگر به عنوان ویروس واکسن کلاسیک شناسائی شد. بر اساس آنالیز فیلوژنیک تمام پنج سویه ویروس گامبوروی فیلدی ارتباط نزدیکی با یکدیگر داشته و بر اساس توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنیک، به احتمال خیلی قوی بیماری گامبوروی ایجاد شده در این قسمت از عراق، تیپ خیلی حد (vVIBD) بوده است (۲). برای دستیابی به امینیت مناسب و مقاومت کافی در برابر ویروس حد گامبوروی، زمان دادن واکسن، یکنواختی عیار آنتی‌بادی مادری، نوع واکسن و روش دادن واکسن از مهم‌ترین نکاتی است که باید به آن توجه نمود، به ویژه این‌که حساسیت طیور و ابتلای آن‌ها بیشتر در دوره زمانی خاصی (سه تا شش هفتگی) اتفاق می‌افتد. در حقیقت فرصت زیادی برای ایجاد مقاومت از طریق تحریک دستگاه ایمنی بدن طیور به تولید پادتن‌های اختصاصی علیه بیماری گامبوروی وجود ندارد. در این شرایط بایستی با تنظیم و اجرای دقیق برنامه واکسیناسیون علیه بیماری، اولاً بدن طیور را به تولید پادتن بر ضد این بیماری واداشت و ثانیاً با تلقیح نوبت‌های بعدی واکسن، سطح ایمنی بدن طیور را به حدی رساند تا در صورت مواجهه با ویروس وحشی، مقاومت کافی وجود داشته باشد. در حقیقت تلقیح واکسن شرط اساسی و اولیه برای موفقیت آمیز بودن اجرای آن است. با توجه به کاهش میزان آلودگی گله‌های گوشتی استان گیلان به فرم حد کلینیکی در چند سال اخیر، نتایج مطالعه نشان می‌دهد که ویروس فوق حد گامبوروی در گله‌های گوشتی در حال چرخش بوده و رعایت موارد فوق (امینیت زیستی) جهت کاهش خسارت اقتصادی توصیه

(۱۰). ویروس فوق حد گامبوروی برای اولین بار در ایران توسط آقاخان و همکاران در سال ۱۹۹۴ با تلفات ۷۵ درصد در نیمچه‌های تخم‌گذار و ۲۵ درصد در جوجه‌های گوشتی شناسائی، و به نام G2212/91 نام‌گذاری شد. این سویه‌ها جزو سروتیپ یک بوده که با تغییر مختصر آنتی‌ژنی در پروتئین VP۲ و حذف یک اپی‌توپ سبب تغییر قابل توجهی در بیماری‌زایی ویروس گامبوروی شده بود (۱). با توجه به گزارشات درگیری گله‌ها به صورت کلینیکی در سطح کشور به سویه‌های فوق حد، در مطالعه حاضر برای شناخت بیشتر حدت ویروس از روش هضم آنزیمی مشابه با مطالعه تعدادی از محققین از دو آنزیم *SacI* و *BspMI* استفاده شد که آنزیم *SacI* نتوانست بر روی سویه‌های فوق حد موجود و نمونه‌های اخذ شده برش ایجاد نماید (vVIBD) اما بر روی سویه واکسینال برش هضمی ایجاد نمود (cvIBD+) (شکل ۳). در حالی که آنزیم *BspMI* بر روی سویه فوق حد و چهار نمونه اخذ شده از موارد کلینیکی بیماری توانست برش هضمی ایجاد کند (vVIBD+) اما اثر آن بر روی سویه واکسینال منفی بود (-) (شکل ۴). قریشی و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای تشخیص نمونه‌های کلینیکی قسمتی از ژن VP۲ ویروس به طول ۷۴۳ نوکلئوتید را در آزمایش RT-PCR تکثیر کردند و برای تشخیص تفریقی سویه ویروس فیلد از سویه ویروس‌های واکسن، هضم محصول PCR با دو آنزیم *BstNI* و *MboI* انجام شد که نتایج نشان داد که ویروس فیلدی الگوی متفاوتی با سویه‌های ویروس واکسن تولید نموده و این امر به علت وجود جهش نقطه‌ای در ژن VP۲ ویروس فیلد نسبت به ویروس واکسن بوده که باعث بروز اختلاف در توالی اسیدهای آمینه ای برای ویروس می‌شود و در نتیجه خواص آنتی‌ژنی و پاتوژنیسیته‌ی ویروس را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴).

رزیمار و پیغمبری در سال ۲۰۰۸ پس از نمونه‌برداری از ۴۹ گله مرغ تخم‌گذار مشکوک به بیماری و بعد از تکثیر قطعه ۷۴۳ جفت باز ناحیه بسیار متغیر ژن VP۲، از دو آنزیم *BspMI* و *SacI* در آزمایش استفاده نمودند. ۳۷ نمونه (۷۵/۵ درصد) در آزمایش RT-PCR مثبت بوده و از ۳۷ مورد تعداد ۳۴ نمونه (۹۱/۹ درصد) مربوط به سویه فوق حد (vVIBD) و سه مورد مربوط به سویه کلاسیک بوده است (۱۱). شوشتری و همکاران در سال ۲۰۰۵ با نمونه‌گیری از بورس ۴۵ گله مرغ گوشتی استان تهران در سنین ۱۲-۱۰ روزگی، تنها در دو گله یک باند ۶۴۳ جفت بازي در RT-PCR و ۵۵۲ جفت بازي در PCR آشیانه‌ای تکثیر و مشاهده کردند. برای تشخیص سویه واکسینال از سویه فوق حد آنزیم‌های *SacI* و *SspI* استفاده شد. آنزیم *SacI* نتوانست محصولات PCR دو جدایه را برش دهد که این مشخصه جدایه‌های فوق حد ویروس بیماری عفونی بورس طیور بوده و در عوض آنزیم *SspI* محصول PCR جدایه را برش داده اما بر جدایه دیگر تأثیری نداشته است. با توجه به اینکه استثنائاتی در مورد یک آنزیم ممکن است ایجاد شود، فلذا توصیه شد که برای هضم آنزیمی از چند آنزیم استفاده شود اما می‌توان هضم آنزیم *SacI* را ملاک عمل قرار داد که در نتیجه دو جدایه از نظر حدت جزو جدایه‌های فوق حد بوده‌اند (۱۲).

زرنبرگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ با تکثیر یک باند ۷۲۳ جفت بازي در RT-PCR، از دو آنزیم *SacI* و *BspMI* در آزمایش هضم آنزیمی استفاده نمودند. آنزیم *SacI* تنها بر روی محصول RT-PCR سویه کلاسیک

- analysis. *Journal Virological Methods* 48: 281-291.
- 7- Makadiya, N.R. 2004. Detection of infectious bursal disease virus from bursal tissue by RT-PCR and its comparative efficacy with conventional precipitation assays. V.Sc. Thesis Anand Agricultural University, Anand.
- 8- Mittal, D., N. Jindal, S. L. Gupta, R. S. Kataria and A K. Tiwari. 2005. Detection of Infectious Bursal Disease Virus in Field Outbreaks in Broiler Chickens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Poultry Science* 4 (4): 239-243.
- 9- OIE Terrestrial Manual. (2008). Infectious Bursal Disease (Gumboro disease), Capter 2 . 3. 1 2. : 549-565.
- 10- Ramzy, N., S. Abdel-Fattah and M. Abdel-Dayem. 2015. Prevalence and Molecular characterization of Gumboro virus in chicken farms in Ismailia. *Assiut Vet Med J* 61 (145): 152-159.
- 11- Razmyar, J. and S M. Peighambari. 2008. Rapid differentiation between very virulent and classical infectious bursal disease viruses isolated in Iran by RT-PCR /REA. *Int J Vet Res*, 2 (1):111-117.
- 12- Shoushtari, A H., S. A. Pourbakhsh, H. A. Dadras, M. Bahmaninejad and R. Toroghi. 2005. Pathogenicity study and restriction enzyme profile of a recently isolated infectious bursal disease virus in Iran. *Archives of Razi Institute* 58: 9-18.
- 13- Toroghi, R., J. Kataria and M. V. Balamurugan. 2003. Differentiation of classical very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Acta virologica* 47: 259 –263.
- 14- Zahoor, MA., M. Abubakar, S. Naimc, Q. M. Khand and M. Javed Arshed. 2010. Incidence and Molecular Characterization of Infectious Bursal Disease Virus in Commercial Broilers in Pakistan. *IJAVMS* 4(3): 75-80.
- 15- Zierenberg, K., R. Raue and H. Muller. 2001. Rapid identification of very virulent strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription- polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathology* 30: 55-62.

و در مطالعات بعدی، شناسایی فرم تحت کلینیکی بیماری گامبورو در سنین پایین تر از سه هفتگی پیشنهاد می‌شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی جهت تخصیص اعتبارات مالی این پروژه با کد (۹۰۰۸-۱۸-۵۸-۲) و از ناظر محترم جناب آقای دکتر طرقي و همکاران محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان تقدیر و تشکر به عمل آورند.

### منابع مورد استفاده

- 1-Aghakhan, S.M., N. Abshar, S.R. Fereidouni, C. Marunesi and M. Khodashenas. 1994. Studies on avian viral infectious bursal disease in Iran. *Archives de L'Institute Razi* 44(45): 1-5.
- 2-Amin, O. G and D.J. Jackwood . 2014. Identification and molecular analysis of infectious bursal disease in broiler farms in the Kurdistan Regional Government of Iraq. *Tropical Animal Health Production* 46(7): 1297-301.
- Eterradossi, N. and Y. M. Saif. 2003. Infectious Bursal Disease in : Saif, Y.M, Calnek, B.W, Barnes, et al, Disease of poultry. Chapter 7 (12th eds). Ames. Iowa state university press. PP:85-208.
- 4- Ghoraishi, S.A., T.Hajian, and D. morshedi. 2003. Detection of infectious bursal disease virus in clinical samples and differentiation from vaccinal strain by RT- PCR- RFLP. *Pajouhesh & Sazan-degi* 60:65-69 [In Farsi].
- 5- Kataria, R.S., A. K. Tiwari, S. K. Bandyopadhyay, J. M. Kataria and G. Butchaiah. 1998. Detection of infectious bursal disease virus of poultry in clinical samples by RT-PCR. *Biochem Mol Biol Int* 45:315-322.
- 6- Liu, H. J., J. J. Giambrone and T. Dormitorio. 1994. Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease

