DOI: 10.22092/vj.2017.109872 شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

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

• **یداله اسدپور (نویسنده مسئول)**

بخش تحقیقات دامپزشکي، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزي و منابع طبیعي استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي ، رشت، ایران

• **ابراهیم رحیم آبادی**

بخش تحقیقات دامپزشکي، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزي و منابع طبیعي استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي ، رشت، ایران

• **عبدالحمید شوشتري**

بخش تحقیق و تشخیص بیماریهاي طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازي رازي، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي ، کرج، ایران

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

Email: 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 سویه‌هاي 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، آزمایشPCR 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 *Sac*I و *Bsp*MI صورت گرفت و نتایج هضم ثبت گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده هر چهار گله مبتلا به ویروس فوق حاد بیماری گامبورو vvIBD تشخیص داده شد. نتیجه اینکه در چندسال اخیر علي‌رغم کاهش موارد حاد کلینیکي بیماري گامبورو، سویه فوق حاد در گله‌هاي گوشتي استان گیلان در حال چرخش بوده و مطالعه بعدي شناسائي تحت کلینیکي بیماري گامبورو در سنین پائین توصیه مي‌شود.

کلمات کلیدی: گامبورو، Nested-PCR، RT-PCR، هضم آنزیمی، طیورگوشتی

● 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) Veterinary Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Iran. Rahimabadi, E., Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Iran. and Shooshtari. A., Department of Research and Diagnosis of Poultry Disease Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREEO, 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 (*Sac*I and *Bsp*MI) and results were recorded. Results showed that vvIBD was detected in all 4 flock bursal samples. In conclusion, in spite of redction 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

مقدمه

بيماري عفوني بورس (گامبورو) يك بيماري حاد و بسيار واگيردار طيور بوده و به علت تلفات برخي سويه‌هاي ويروس در جوجه‌هاي بالاي سن سه هفتگي كه تا بيش از ۲۰ درصد گزارش شده، داراي اهميت اقتصادي مي‌باشد و همچنين در جوجه‌هايي با سنين پائين‌تر، موجب تضعيف سيستم ايمني به مدت طولاني شده و صدمات اقتصادي آن بيشتر به دنبال عواقبي نظير عدم پاسخ مناسب سيستم ايمني به برنامه‌هاي واكسيناسيون و بروز بيماري‌هاي مختلف مي‌باشد (۳). ويروس گامبورو از خانواده بيرناويريده و يكي از اعضاي جنس بيرناويروس مي‌باشد. ژنوم آن از دو قطعه RNA دو رشته‌اي تشكيل شده، قطعه بزرگ ژنوم به نام قطعهA داراي ۳۴۰۰ جفت باز و قطعه كوچك آن به نام B داراي ۲۹۰۰ جفت باز است. قطعه B حاوي كد لازم براي ساخت پلي پپتيد VP۱ بوده در حاليكه قطعه A چهار پلي پپتيد، VP۲، VP۳، VP۴ و VPX را كد مي‌نمايد. ويروس گامبورو دو سروتيپ داشته كه از نظر ريخت‌شناسي و اندازه يكسان و همچنين داراي آنتي‌ژن مشترك مي‌باشند. سروتيپ يك براي ماكيان بيماري‌زا است اما در بوقلمون مي‌تواند سبب آلودگي شده و آنتي‌بادي ايجاد نمايد. سروتيپ دو ابتدا از بوقلمون جدا شده كه براي ماكيان و بوقلمون غيربيماري‌زا مي‌باشد (۳،۹). به منظور تشخيص بيماري گامبورو از روش‌هاي مختلفي مانند جداسازي ويروس در تخم‌مرغ‌هاي جنين‌دار و كشت سلول، آزمايش رسوب در ژل آگار(AGPT)، آزمايش خنثي‌سازي سرم و يا ويروس(VN و SN)، ايمونوفلورسانس مستقيم و غيرمستقيم و روش مولكولي استفاده مي‌شود. روش مولكولي نسبت به ساير روش‌ها از حساسيت بيشتري برخوردار بوده و ساير روش‌ها براي تشخيص بسيار وقت‌گير مي‌باشند ماكاديا در سال ۲۰۰۴ با بررسی بر روی پنج فارم و اخذ۳۰ نمونه بورس از گله‌های درگير به روش سرولوژی و مقايسه آن‌ها با روش مولكولی RT-PCR نشان داد كه نتيجه آزمايش مولكولی بسته به نوع آزمايش سرولوژی ۳۰-۱۵ درصد بهتر بوده است (۷). تكثير قطعات ژنتيكي يك ويروس ناشناخته به كمك پرايمرهاي اختصاصي و با روش PCR مي‌تواند هويت ويروس را مشخص سازد چون جهت تكثير قطعات ژنومي ويروس‌هاي داراي RNA بايد يك نسخه برداري معكوس يعني از RNA به DNA صورت گيرد. تكثير اين قطعات را به اختصار RT-PCR گويند. روش مولكولي RT-PCR و آناليز مولكولي آن با RFLP با استفاده از آنزيم‌هاي اندونوكلئاز محدودكننده (RE) براي رديابي ويروس بيماري گامبورو و تعيين حدت ويروس در نمونه‌هاي كلينيكي به عنوان روشی بسيار دقيق و سريع استفاده شده است (۹). از آن‌جايي‌كه يكي از راه‌هاي پيشگيري از بيماري گامبورو، استفاده از واكسيناسيون بوده اما علي‌رغم استفاده از واكسن‌هاي زنده سويه كلاسيك از نوع اينترمديت، شاهد درگيري گله‌هاي گوشتي استان به شكل كلينيكي بوده‌ايم و در واقع اين

مطالعه سعي نموده تا ضمن تایید تشخیص فرم کلینیکي بیماري گامبورو با روش مولکولي،حدت سویه‌هاي درگیر را شناسائي نماید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداري

در طول این مطالعه توصیفي از پنج درصد مرغداري‌هاي استان، تعداد ۴۰ مرغداري تحت بررسي قرار گرفت و از گله‌هائي با افزایش منحني تلفات سه تا پنج روزه و با مشاهده علائم کالبدگشائي در ۱۰ مرغ تلف شده از نظر پتشي و اکیموز در عضلات سینه و ران، حدفاصل بین پیش معده و سنگدان و از همه مهم‌تر وضعیت تورم بورس و ترشحات اکسودایي و پتشي، به بیماري گامبورو مشکوك شده و نمونه‌گیري انجام شد. پنج بورس فابریسیوس جدا و در یك لوله فالکون جمع‌آوري و نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتي‌گراد نگهداري شد (براي شناسائي آلودگي گله، پنج بورس به عنوان یك نمونه در آزمایش محاسبه شد). میزان تلفات گله‌ها چهار تا ۱۰ درصد و واکسن مصرفي از سویه اینترمدیت بود که در روزهاي ۱۴ و ۲۸ به صورت آشامیدني استفاده شده بود. مراحل زیر جهت شناسایي ویروس انجام شد.

تزریق به تخم‌مرغ جنین‌دار SPF

از نمونه‌ها ي بورس فابریسیوس با استفاده از سالین بافر فسفات (PBS) سوسپانسیون ۲۰ درصد تهیه شد و آنتي بیوتیك‌هاي پني‌سیلین ۱۰۰۰۰ واحد در میلي‌لیتر و دي‌هیدرواستریتومایسین ۱۰۰۰۰ میلي‌گرم در میلي‌لیتر به آن اضافه شد. سپس بعد از سه بار انجماد و ذوب، سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه انجام شد و مایع‌رویي حاصل برداشت گردید. مقدار ۰/۲ میلي‌لیتر از مایه‌رویي به تعداد پنج تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ تا ۱۱ روزه SPF بعد از علامت‌گذاري محل تزریق و ضدعفوني کردن آن با محلول تنطوید و الکل ۷۰ درصد، بر روي پرده کوریوآلانتوئیك تلقیح شد. از مایع هموژنیزه نمونه‌هاي کلینیکي بورس جهت استخراج RNA استفاده شد.

استخراج RNA

بر اساس دستور سازنده کیت High Pure Vired Neucleic Acid Kit (Roche-Germany) مراحل استخراج RNA انجام شد. واکنش RT جهت ساخت رشته‌cDNA 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 نوکلئوتیدي ۶۰۴-۵۸۷) و Reverse 5'-TCAGGATTTGGGATCAGC-3' (با موقعیت نوکلئوتیدي ۱۲۲۹-۱۲۱۲) (۶) ، دو میکرولیتر dNTPs، یک میکرولیتر آنزیم M-MuLV RT 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 VP۲ قرار داشت، در یک واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل چهار میکرولیتر ازcDNA، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، یک میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم *Taq*DNA پلی مراز، دو میکرولیتر بافر PCR و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با تنظیم برنامه حرارتي و زماني واسرشت شدن ابتدایی ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه (یك چرخه)، ۳۵ چرخه اصلي واسرشت، اتصال و ساخت به ترتیب در درجه حرارت ۹۴، ۵۱،۷۲ درجه سانتی‌گراد و هرکدام به مدت یک دقیقه و در آخر بسط انتهایي۷۲ درجه در ۱۰ دقیقه (یك چرخه) انجام شد. در انتها محصول PCR بر روي ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزي با محلول اتیدیوم بروماید، نتایج آن با استفاده از تابش اشعه UV به ژل ذخیره شد.

روش

Nested-PCR (PCR آشیانه‌اي)

براي تائید بیشتر PCR از روش PCR آشیانه‌اي استفاده شد و برای این منظور از تکثیر اولیه (۶۴۳ جفت باز) به نسبت۱:۱۰ رقیق‌سازی و از پرایمر های طراحی شده Forward 5'–CGCTATAGCGCTTGACCCAAAAA-3'

(موقعیت نوکلئوتید ۶۷۳-۶۵۱) و

Reverse 5'-CTCACCCCAGCGACCGTAACGACG-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.

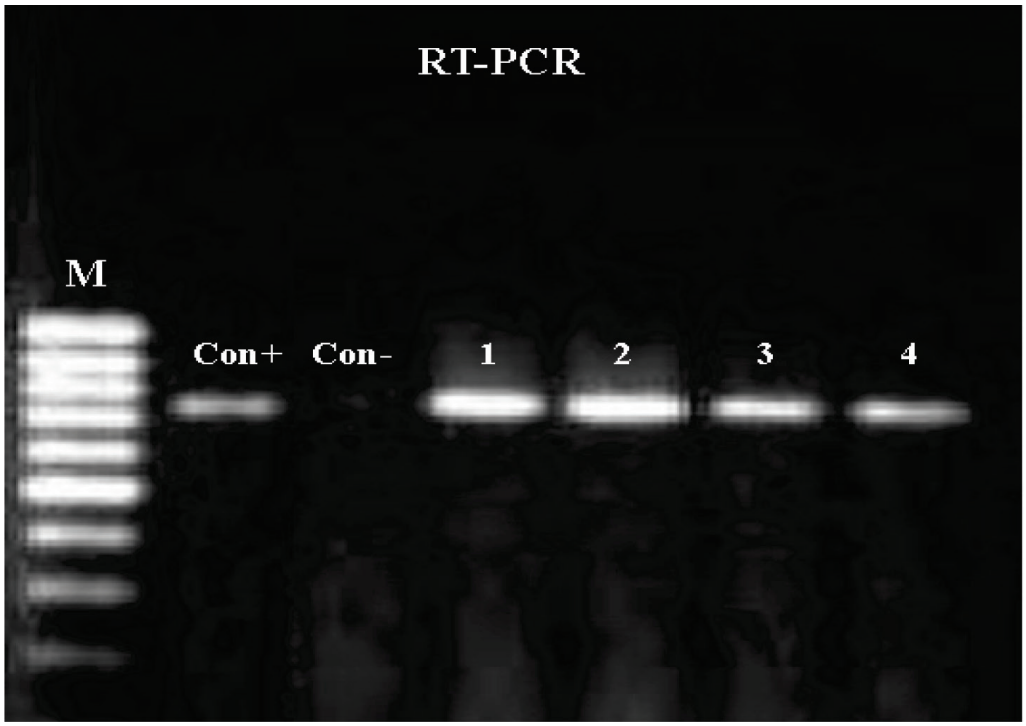
روش

RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism)

به منظور بررسی حدت نمونه‌های فیلد از دو آنزیم محدودکننده *Sac*I و *Bsp*MI به طور جداگانه استفاده شد. آزمایش هضم شامل سه میکرولیتر بافر X۱۰، 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 واکسن اینترمدیت D_{78} و Bursin۲ به عنوان سویه واکسینال و ازIR۴۹۹ به عنوان سویه فوق حاد ایرانی استفاده شد.

نتایج

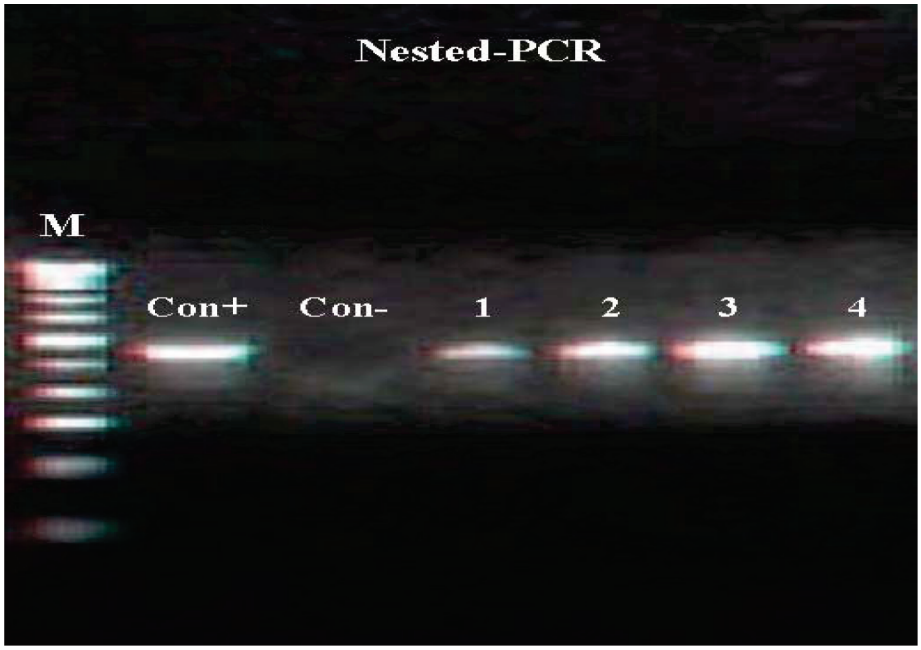
از تعداد ۴۰ گله‌ی تحت بررسی که از نظر علائم کلینیکي و کالبدگشایي، بیماري گامبورو در چهار گله (۱۰ درصد)(جدول۱) تشخیص داده شد. در تلقیح نمونه‌هاي بورس به پرده کوریوآلانتوئیك تخم‌مرغ جنین‌دار، تلفات جنیني مشاهده شد. ضایعات ایجاد شده شامل پرخوني و ادماتوز بودن جنین، پرخوني و افزایش ضخامت پرده کوریوآلانتوئیك و آثار نکروز بر روي کبد بود. در روش RT-PCR چهار نمونه کلینیکي، یك باند ۶۴۳ جفت باز در ناحیه بسیار متغیر ژن VP۲ (شکل ۱) و در روش PCR آشیانه‌ای یك باند۵۵۲ جفت باز تکثیر و مشاهده شد (شکل ۲). روش هضم آنزیمي نیز نشان‌دهنده عدم هضم آنزیم *Sac*I بر چهار نمونه کلینیکي و تشخیص سویه فوق حاد (+ vv IBD) (شکل ۳) و هضم آنزیم *Bsp*MI بر چهار نمونه کلینیکي و تشخیص سویه فوق حاد (+ vv IBD) (شکل ۴) بود.



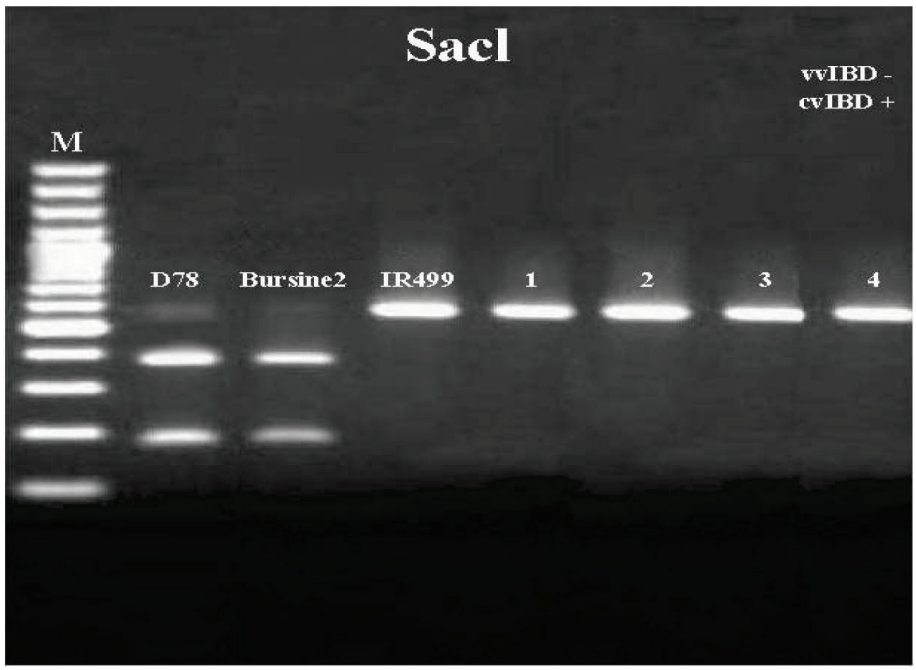
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز یک درصد، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، Con^+: کنترل مثبت ، Con^-:کنترل منفی، ۴-۱: نمونه های کلینیکی مثبت با تشکیل باند ۶۴۳ جفت بازی.

جدول ۱- مشخصات وضعیت گله‌های 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^+: کنترل مثبت، Con^-: کنترل منفی، ۴-۱: نمونه‌های کلینیکی مثبت با تشکیل باند ۲۵۵ جفت بازی.



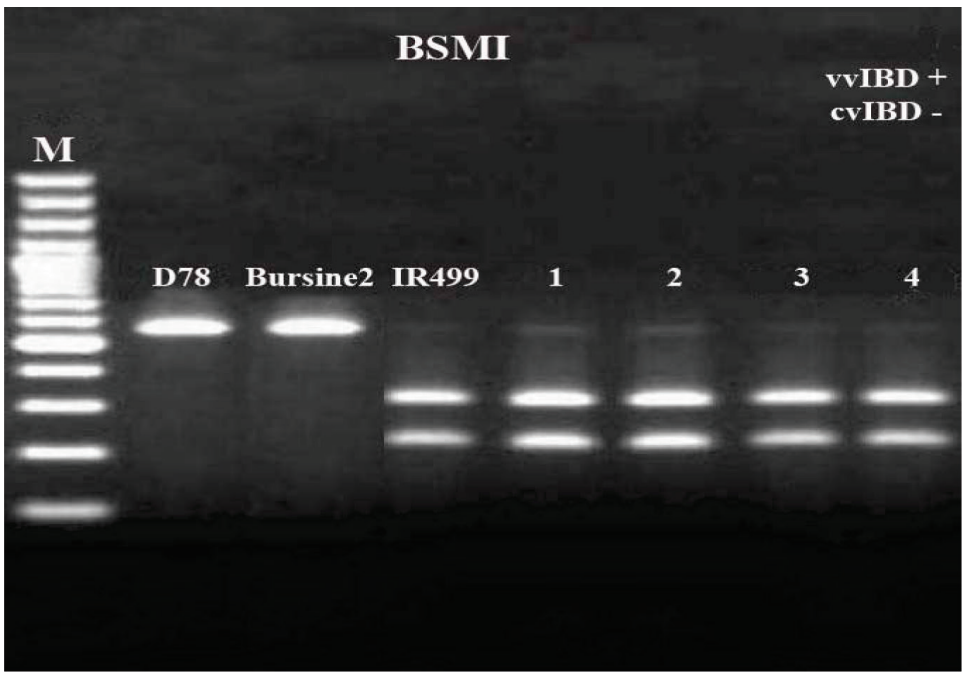
شکل ۳- هضم محصول PCR در ژل آگارز دو درصد با آنزیم *SacI*، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، D78: سویه کلون شده اینترمدیت، Bursine2 سویه غیرکلون اینترمدیت، IR499: سویه فوق حاد ایرانی، ۴-۱: نمونه‌های کلینیکی مثبت.

بحث

در مطالعه حاضر از تعداد ۴۰ گله تحت بررسي، در چهار گله (۱۰ درصد) علائم حادکلینیکي بیماری گامبورو مشاهده شد و با تکثیر باند ۶۴۳ جفت بازی در آزمایش مولکولي RT-PCR و تکثیر باند ۵۵۲ جفت بازي در روش PCR آشیانه‌اي، شناسایی بیماري گامبورو در نمونه‌های بورس هر چهار گله تایید شد. (جدول ۱، شکل۱ و ۲). میتال و همکاران در سال۲۰۰۵ در ایالت هاریانا کشور هندوستان از ۱۰۱ گله گوشتی با علائم کلینیکی و یافته‌های کالبدگشایی مشکوک به بیماری گامبورو، نمونه‌های بورس ۲۰ گله را به‌طور تصادفی براي تشخیص ویروس بورس عفونی به روش RT-PCR جمع‌آوري 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 براي تشخیص بیماری گامبورو مورد استفاده قرار گیرد (۸).

ظهور و همکاران در سال ۲۰۱۰ در پاکستان نمونه‌هاي بورس گله‌هاي گوشتي واکسینه شده و غیرواکسینه داراي علائم کلینیکي به بیماري گامبورو را با روش مولکولی بررسي نمودند. یك قطعه ۷۴۳ جفت باز از ناحیه متغیر ژن VP۲ از نوکلئوتیدهاي ۱۴۴۴-۷۰۱ تکثیر شد. از ۲۳۷ نمونه آزمایش شده، تعداد۱۰۳ نمونه (۴۳/۴۵ درصد) از نظر ژنوم ویروس بیماري 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 هفتگي، ۵۶/۳ درصد در سه تا شش هفتگي و ۳۳/۳۴ درصد در شش تا هشت هفتگي بود. نتایج نشان‌دهنده شیوع بیماري گامبورو در گله‌هاي واکسینه ۴۷/۹۱ درصد و در گله‌هاي واکسینه نشده ۳۵/۵ درصد بوده است (۱۴).

رمزي و همکاران در سال ۲۰۱۵ در اسماعیلیه مصر نمونه‌هاي بورس۲۰ فارم گوشتي داراي عملکرد پائین و با علائم کلینیکي و کالبدگشایي را با روش RT-PCR بررسي کردند. در این روش یك باند ۶۲۰ جفت بازي در سه فارم (۱۵ درصد) از ۲۰ فارم تکثیر شد. نمونه‌هاي مثبت براي آنالیز توالي نوکلئوتیدي (۲۶۵ نوکلئوتید در ناحیه بسیار متغیر ژن VP۲) بررسي شد. آنالیز و بلاست توالی اسید آمینه و نوکلئوتید نشان داد که جدایه‌هاي اسماعیلیه مصر ارتباط نزدیکي با جدایه‌هاي قبلي ویروس گامبورو داشته است و تقریبا ۹۹ درصد آن‌ها در یك خوشه (کلاستر) بوده‌اند. در صورتي‌که سویه‌هاي واکسن کلاسیك تخفیف حدت‌یافته (بورسین و بورساواك) در گروه دیگري به ترتیب ۹۲/۴۵ درصد و ۹۱/۳۲ درصد تشخیص داده شد



شکل ۳- هضم 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 حاد ایرانی، ۴-۱: نمونه های کلینیکی.

(۱۰). ویروس فوق حاد گامبورو براي اولين بار در ايران توسط آقاخان و همكاران در سال ۱۹۹۴ با تلفات ۷۵ درصد در نيمچه‌هاي تخم‌گذار و ۲۵ درصد در جوجه‌هاي گوشتي شناسائي، و به نام G2212/91 نام‌گذاري شد. اين سويه‌ها جزو سروتيپ يك بوده كه با تغيير مختصر آنتي‌ژني در پروتئين VP۲ و حذف يك اپي توپ سبب تغييرقابل توجهي در بيماري‌زايي ويروس گامبورو شده بود (۱). با توجه به گزارشات درگيري گله‌ها به صورت كلينيكي در سطح كشور به سويه‌هاي فوق حاد، در مطالعه حاضر براي شناخت بيشتر حدت ويروس از روش هضم آنزيمي مشابه با مطالعه تعدادي از محققين از دو آنزيم *Sac*I و *Bsp*MI استفاده شد كه آنزيم *Sac*I نتوانست بر روي سويه‌هاي فوق حاد موجود و نمونه‌هاي اخذ شده برش ايجاد نمايد(vvIBD-) اما بر روي سويه واكسينال برش هضمي ايجاد نمود (cvIBD+) (شكل ۳). در حالي كه آنزيم *Bsp*MI برروي سويه فوق حاد و چهار نمونه اخذ شده از موارد كلينيكي بيماري توانست برش هضمي ايجاد كند (vvIBD +) اما اثر آن بر روي سويه واكسينال منفي بود (cv IBD -) (شكل ۴). قريشي و همكاران در سال ۲۰۰۳ براي تشخيص نمونه‌هاي كلينيكي قسمتي از ژن VP۲ ويروس به طول ۷۴۳ نوكلئوتيد را در آزمايش RT-PCR تكثير كردند و براي تشخيص تفريقي سويه ويروس فيلد از سويه ويروس‌هاي واكسن، هضم محصول PCR با دو آنزيم *Bst*NI و *Mbo*I انجام شدكه نتايج نشان داد كه ويروس فيلدي الگوي متفاوتي با سويه‌هاي ويروس واكسن توليد نموده و اين امر به علت وجود جهش نقطه‌اي در ژن VP۲ ويروس فيلد نسبت به ويروس واكسن بوده كه باعث بروز اختلاف در توالی اسيدهاي آمينه اي براي ويروس مي‌شود و در نتيجه خواص آنتي‌ژني و پاتوژنيسيته‌ي ويروس را تحت تاثير قرار می‌دهد (۴).

رزميار و پيغمبري در سال ۲۰۰۸ پس از نمونه‌برداري از ۴۹ گله مرغ تخم‌گذار مشكوك به بيماري و بعد از تكثير قطعه ۷۴۳ جفت باز ناحيه بسيار متغير ژن VP۲، از دو آنزيم *Bsp*MI و *Sac*I درآزمايش استفاده نمودند. ۳۷ نمونه (۷۵/۵ درصد) در آزمايش RT-PCR مثبت بوده و از ۳۷ مورد تعداد ۳۴ نمونه(۹۱/۹ درصد) مربوط به سويه فوق حاد (vvIBD) و سه مورد مربوط به سويه كلاسيك بوده است (۱۱). شوشتري و همكاران در سال ۲۰۰۵ با نمونه‌گيري از بورس ۴۵ گله مرغ گوشتي استان تهران در سنين۱۲-۱۰ روزگي، تنها در دو گله يك باند ۶۴۳ جفت بازي در RT-PCR و ۵۵۲ جفت بازي در PCR آشيانه‌ای تكثير و مشاهده كردند. براي تشخيص سويه واكسينال از سويه فوق حاد آنزيم‌هاي SspI و SacI استفاده شد. آنزيم SacI نتوانست محصولات PCR دو جدايه را برش دهد كه اين مشخصه جدايه‌هاي فوق حاد ويروس بيماري عفوني بورس طيور بوده و در عوض آنزيم SspI محصول PCR جدايه را برش داده اما بر جدايه ديگر تاثيري نداشته است. با توجه به اينكه استثنائاتي در مورد يك آنزيم ممكن است ايجاد شود، فلذا توصيه شد كه براي هضم آنزيمي از چند آنزيم استفاده شود اما مي‌توان هضم آنزيم SacI را ملاك عمل قرار داد كه در نتيجه دو جدايه از نظر حدت جزو جدايه‌هاي فوق حاد بوده‌اند (۱۲).

زرنبرگ و همكاران در سال ۲۰۰۸ با تكثير يك باند۷۲۳ جفت بازي در RT-PCR ، از دو آنزيم SacI و BspMI درآزمايش هضم آنزيمي استفاده نمودند. آنزيم SacI تنها بر روي محصول RT-PCR سويه كلاسيك توانست برش ايجاد كند و در سويه‌هاي فوق حاد بي‌تاثير بود و در عوض آنزيم BspMI بر روي سويه‌هاي فوق حاد برش آنزيمي ايجاد نموده و بر روي سويه‌هاي كلاسيك نتوانست هضم آنزيمي ايجاد نمايد (۱۵). تعدادي از محققين از شناسايي و آناليز توالي نوكلئوتيدي و فيلوژنيك استفاده نموده و حدت ويروس و خاستگاه آن را تعيين نمودند كه موارد باليني بيماري بيشتر از نوع فوق حاد بوده است. طرقي و همكاران در خراسان جنوبی تعداد ۱۰ ويروس بيماری گامبورو تائيد شده با روش مولكولي را تعيين توالي نمودند. آناليز توالی اسيدهای آمينه ترجمه شده در ناحيه بسيار متغير ژن VP۲ اين ويروس‌ها نشان داد كه اسيدهای آمينه در موقعيت ۲۲۲ (A)، ۲۵۶ (I)، ۲۹۴ (I)، ۲۹۹ (S) و همچنين هپتاپپتيد غنی از سرين SWASASGS در نه ويروس شناسائی شد. از اين ميان هفت ويروس كاملا شبيه يكديگر و شبيه ويروس بسيار حاد گامبورو گزارش شده از اروپا، آسيا و ايران بود. دو ويروس ديگر به ترتيب با يک و سه اسيد آمينه متفاوت از ساير ويروس های بسيار حاد بودند. تغيير اسيد های آمينه كليدی موقعيت ۲۴۲ (I به N) و ۲۷۹ (D به N) برای اولين بار در ويروس‌های بسيار حاد ايرانی در يک ويروس شناسايی شد. اسيدهای آمينه ويروس ديگر شبيه به ويروس‌های كلاسيک با حدت كم بود اما به هيچيک از ويروس‌های واكسن بيماری گامبورو شبيه نبود. آناليز فيلوژنيک نشان داد كه خاستگاه ويروس‌های بسيار حاد مورد مطالعه با خاستگاه ويروس‌های بسيار حاد بيماری گامبورو در اروپا و آسيا يكسان بوده است (۱۳). در مطالعه‌ی امين و جك وود درسال ۲۰۱۴ در اقليم خودمختار كردستان عراق، با شناسائي ۱۰ نمونه از ۲۹ نمونه بورس فابريسيوس طيور گوشتي در RT-PCR و آناليز مولكولي توالي نوكلئوتيدي، پنج ويروس گامبورو به عنوان ويروس خيلي حاد (vvIBD)، دو نمونه به عنوان ويروس واكسن كلاسيك و سه نمونه ديگر به عنوان ويروس واكسن كلاسيك شناسائي شد. بر اساس آناليز فيلوژنيك تمام پنج سويه ويروس گامبوروي فيلدي ارتباط نزديكي با يكديگر داشته و بر اساس توالی نوكلئوتيدي و آناليز فيلوژنيك، به احتمال خيلي قوي بيماري گامبوروی ايجاد شده در اين قسمت از عراق، تيپ خيلي حاد (vvIBD) بوده است (۲). برای دست‌يابی به امنيت مناسب و مقاومت كافی در برابر ويروس حاد گامبورو، زمان دادن واكسن، يكنواختی عيار آنتی‌بادی مادری، نوع واكسن و روش دادن واكسن از مهم‌ترين نكاتی است كه بايد به آن توجه نمود، به ويژه اين‌كه حساسيت طيور و ابتلای آن‌ها بيشتر در دوره زمانی خاصی(سه تا شش هفتگی) اتفاق می‌افتد. در حقيقت فرصت زيادی برای ايجاد مقاومت از طريق تحريک دستگاه ايمنی بدن طيور به توليد پادتن‌های اختصاصی عليه بيماری گامبورو وجود ندارد. در اين شرايط بايستی با تنظيم و اجرای دقيق برنامه واكسيناسيون عليه بيماری، اولا بدن طيور را به توليد پادتن بر ضد اين بيماری واداشت و ثانيا با تلقيح نوبت‌های بعدی واكسن، سطح ايمنی بدن طيور را به حدی رساند تا در صورت مواجهه با ويروس وحشی، مقاومت كافی وجود داشته باشد. در حقيقت تلقيح واكسن شرط اساسی و اوليه برای موفقيت‌آميز بودن اجرای آن اس. با توجه به كاهش ميزان آلودگي گله‌هاي گوشتي استان گيلان به فرم حاد كلينيكي در چند سال اخير، نتايج مطالعه نشان مي‌دهد كه ويروس فوق حاد گامبورو در گله‌هاي گوشتي درحال چرخش بوده و رعايت موارد فوق (امنيت زيستي) جهت كاهش خسارت اقتصادي توصيه

و در مطالعات بعدي، شناسايي فرم تحت كلينيكي بيماري گامبورو در سنين پايين تر از سه هفتگي پيشنهاد مي‌شود.

تشکر و قدردانی

نويسندگان مقاله برخود لازم مي‌دانند تا از موسسه تحقيقات واكسن و سرم‌سازي رازي جهت تخصيص اعتبارات مالي اين پروژه با كد (۹۰۰۰۸-۱۸-۵۸-۲) و از ناظر محترم جناب آقاي دكتر طرقي و همكاران محترم مركز تحقيقات و آموزش كشاورزي و منابع طبيعي استان گيلان تقدير و تشكر به‌عمل 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 & Sazandegi* 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 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 vrus 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 diseaseVirus . *Acta virologica* 47: 259 –263.

14- Zahoor, MA., M. Abubakarb, 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 transciption- polymerase chain reation combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathology* 30: 55-62.