

جداسازی و شناسائی ویروس بیماری بورس عفونی

● منوچهر عالی مهر، اسناددار بخش بیماری‌های طیور دانشکده دامپزشکی ارومیه
● حبیب‌آباد... دادرس، دانشیار بخش بیماری‌های طیور دانشکده دامپزشکی شیراز
● محمدحسین روستایی، اسناددار بخش ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

برای جداسازی ویروس بیماری بورس عفونی از طحال و بورس فابریسیوس ماکیان مبتلاء به فرم بالینی بیماری استفاده شد. نمونه‌های اخذ شده از طریق پرده کوریو آلتوتونیک به تخم مرغهای SPF حاوی جنین ۱۰ روزه و همچنین کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین ماکیان تلقیح گردیدند. ضایعات ماکروسکوپی مشاهده شده در جنین‌ها شامل: مرگ جنین، پرخونی و خونریزی روی پوست (ناحیه سر، پاها و پشت)، خونریزی روی پرده کوریو آلتوتونیک، نکروز کبدی و حالت نیم پخته بودن قلب بود. کشت سلولی نمونه‌ها چندان موفقیت‌آمیز نبوده و CPE اختصاصی ویروس گامبورو مشاهده نگردید و فقط در پاساژ سوم از نمونه‌های بورس فابریسیوس به میزان جزئی گرد شدن سلولها فیبروبلاست روی داد. در آزمایش رسوب در ژل کمپلکس پادگن - پادتن تشکیل شده و خط رسوبی بین آنها رؤیت شد. در عکسهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ذرات ویروسی با تقارن ۲۰ وجهی و اندازه‌های در حدود ۶۰ نانومتر مشاهده شدند.

مقدمه

بیماری بورس عفونی (Infectious Bursal Disease) یا گامبورو (Gumboro Disease) یک بیماری ویروسی حاد با مرگ و میر زیاد در ماکیان جوان می‌باشد که بافت‌های لمفونیدی، بویژه بورس فابریسیوس هدف اولیه این ویروس می‌باشند، نخستین بار Casgrove (۱۹۶۲) این بیماری را تحت عنوان «نفروز پرندگان» بخاطر ضایعات ایجاد شده در کلیه‌های پرندگان مبتلاء گزارش نمود و از آنجاکه اولین بار بیماری در محلی بنام گامبورو مشاهده شده بود آنرا بیماری گامبورو نامیدند (۵).

Hitchner (۱۹۷۰) واژه بیماری بورس عفونی را برای بیماری گامبورو با توجه به ضایعات اختصاصی آن در بورس فابریسیوس پیشنهاد نمود (۱۶). ویروس گامبورو دارای سروتیپ ۱ و ۱۱ بوده که تنها سروتیپ ۱ آن بیماری‌زا می‌باشد، همچنین سروتیپ ۱ ویروس گامبور دارای سویه‌های استاندارد و واریانت با حدتهای مختلف می‌باشد (۱، ۲، ۳، ۴، ۹، ۱۰ و ۱۸).

از بورس فابریسیوس (۴، ۱۱، ۱۲، ۱۷، ۲۲ و ۲۵)

طحال (۸، ۱۵، ۲۴، ۲۷ و ۲۸) و کلیه‌ها (۸) می‌توان به عنوان نمونه جهت جداسازی ویروس گامبورو استفاده نمود. برای جداسازی ویروس گامبورو می‌توان از تلقیح به تخم مرغ جنین دار و کشت سلولی استفاده نمود. بهترین راه جداسازی و تکثیر ویروس گامبورو، تلقیح نمونه‌ها به پرده کوریو آلتوتونیک جنین ۱۲-۱۰ روزه ماکیان می‌باشد، روشهای تلقیح در کیسه زرده و حفره آلتوتونیک دارای حساسیت کمتری بوده و تیترو ویروس تولید شده نیز پایین تر می‌باشد (۱۶).

ویروس گامبورو می‌تواند به کشت سلولهای ناشی از جنین ماکیان عادت کند و در آنها ایجاد ضایعات سلولی (CPE) بنماید. از سلولهای فیبروبلاست جنین ماکیان (CEF) (۱، ۳، ۹، ۱۷، ۲۲ و ۲۸) لمفوسیت‌های طبیعی و همچنین لاینهای لمفوسیتی B حاصل از تومورهای لکوز لمفونید (۷، ۱۰، ۲۹ و ۳۰) و لاینهای سلولی پستانداران مانند BGM، Vero، MA104 (۱) و ۱۰ برای کشت و جداسازی ویروس گامبورو می‌توان استفاده نمود.

بیماری گامبورو از دو جهت دارای اهمیت اقتصادی است، اول بخاطر ایجاد تلفات سنگین در گله‌های مبتلاء به فرم بالینی حاد و دوم به علت ایجاد سرکوب ایمنی شدید و طولانی مدت. در جوجه‌هایی که در روزهای اول زندگی به فرم تحت بالینی بیماری مبتلاء می‌شوند سرکوب ایمنی شدیدتر می‌باشد.

مواد و روش کار

۱- اخذ نمونه‌ها

برای جداسازی ویروس گامبورو بورس فابریسیوس و طحال پرندگان مبتلاء به فرم بالینی بیماری اخذ و طبق روش معمول اقدام به آماده‌سازی و تهیه نمونه برای تلقیح به تخم مرغ جنین دار و کشت سلول گردید (۲۵).

۲- تلقیح به تخم مرغهای SPF

۱۰۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده از طریق پرده کوریو آلتوتونیک به تخم مرغهای SPF دارای جنین ۱۰ روزه تلقیح می‌شد (۲۵). در هر بار تلقیح ۴ عدد تخم مرغ با نمونه طحال و ۴ عدد با نمونه بورس و ۲ عدد به عنوان کنترل مورد استفاده قرار می‌گرفت. تخم مرغهای تلقیح شده به مدت ۳ تا ۵ روز در گرمخانه ۲۷ درجه سانتیگراد گذاشته می‌شد و تلفات ۲۴ ساعت اول به عنوان خطای تلقیح تلقی شده و تلفات بعدی به عنوان نتایج کار مورد بررسی قرار می‌گرفت. برای پاساژهای بعدی (۳ پاساژ متوالی) از پرده کوریو آلتوتونیک و صلایه جنینهای تلف

شده استفاده می‌شد.

۳- کشت روی سلولهای فیبروبلاست ماکیان
از جنین‌های ۱۰ روزه حاصل از تخم مرغهای SPF به روش معمول GEF تهیه شده (۲۵) و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در دو لوله کشت سلول تلقیح و در گرمخانه ۲۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت، روزانه و به مدت ۳ تا ۵ روز متوالی لوله‌های کشت سلول از نظر بروز CPE بررسی می‌شد. در کشت سلول نیز ۳ پاساژ متوالی روی نمونه‌ها انجام گرفت.

۴- آزمایش رسوب در ژل (AGP)

از روش Double Immunodiffusion برای مشاهده وجود واکنش بین پادگن (صلایه جنین‌های SPF تلقیح شده و بورس‌های عفونی) و سرم مثبت تهیه شده (۱۳، ۱۴ و ۱۷) استفاده گردید. برای مشخص شدن خط رسوبی حاصله، ژلها با رنگ Amido black 10B (Merck) رنگ‌آمیزی می‌شدند.

۵- تهیه عکس با استفاده از

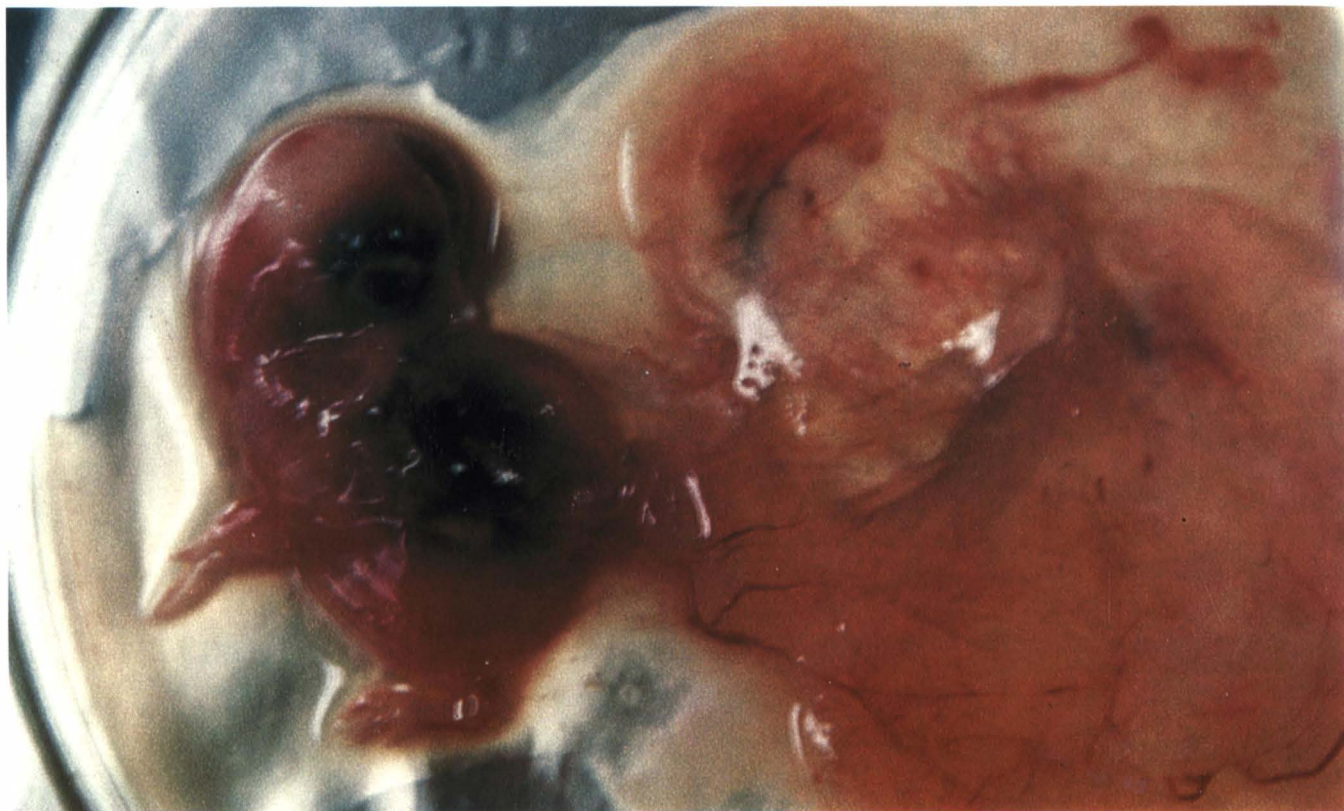
میکروسکوپ الکترونی

از مایع روی لوله‌های کشت CEF و صلایه جنینهای تلقیح شده به عنوان نمونه استفاده گردید. نمونه‌ها با استفاده از فسفوتنگستات سدیم ۴٪ رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ الکترونی (فیلیپس مدل ۳۰۰ هلند) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷ و ۱۹).

نتایج

تلقیح به تخم مرغهای SPF

ضایعات ماکروسکوپی مشاهده شده در تخم مرغهای SPF تلقیح شده شامل مرگ جنینها، پرخونی و خونریزی روی پوست (ناحیه سر، پاها و پشت)، خونریزی روی پرده کوریو آلتوتونیک، نکروز کبدی و حالت نیم پخته بودن قلب بود. ضایعات مشاهده شده در اثر تلقیح نمونه بورس فابریسیوس ۳/۱۲ جنین تلف شده ۳/۱۲ قلب نیم پخته، ۲/۱۲ نکروز کبدی، ۱/۱۲ خونریزی روی پرده کوریو آلتوتونیک و ۳/۱۲ خونریزی روی پوست بود و در نمونه‌های طحال ۲/۱۲ تلفات جنین، ۱/۱۲ قلب نیم پخته، ۲/۱۲ نکروز کبدی، ۱/۱۲ خونریزی روی پرده کوریو آلتوتونیک و ۲/۱۲ خونریزی روی پوست بود و در نمونه‌های طحال ۲/۱۲ جنین تلف شده، ۱/۱۲ قلب نیم پخته، ۲/۱۲ نکروز کبدی، ۱/۱۲ خونریزی روی پرده کوریو آلتوتونیک و ۲/۱۲ خونریزی روی پوست مشاهده گردید.



تصویر شماره ۱- پرخونی و خونریزی روی پوست جنین ماکیان ناشی از ویروس گامبورو

ضایعات ماکروسکوپی ایجاد شده به تفکیک نمونه تلقیحی در جدول شماره ۱ و همچنین تعدادی از ضایعات مشاهده شده در تصاویر شماره ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

کشت سلول

در کشت از نمونه‌های طحال روی فیبروبلاست جنینهای ۱۰ روزه ماکیان، ۳ تا ۵ روز بعد از تلقیح هیچ ضایعه سلولی (CPE) در پاساژهای اول، دوم و سوم مشاهده نشد. در کشت نمونه‌های بورس فابریسیوس در پاساژهای اول و دوم CPE مشاهده نگردید ولی در پاساژ سوم سه روز بعد از تلقیح به میزان جزئی تغییرات سلولی (گرد شدن) مشاهده شد. (تصویر شماره ۴).

آزمایش رسوب در ژل

نتایج حاصله از آزمایش رسوب در ژل نشان داد که آنتی بادی‌های موجود در سرم مثبت و پادکن‌های موجود در نمونه‌ها یکدیگر را شناسایی کرده و در ناحیه‌ای تشکیل کمپلکس پادکن - پادتن داده که در نهایت به صورت خط رسوبی قابل مشاهده می‌باشد (تصویر ۵).

عکسهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

ویروس‌های مشاهده شده در عکسهای تهیه شده دارای تقارن بیست وجهی بودند که در سطح مقطع به صورت ذرات ۶ وجهی دیده می‌شدند. اندازه این ذرات

ویروسی در حدود ۶۰ نانومتر برآورد گردید (تصویر ۶).

بحث

با توجه به نوع ضایعات مشاهده شده می‌توان اظهار نمود که ضایعات ماکروسکوپی ایجاد شده در تخم‌مرغهای SPF تلقیح شده در این بررسی، شبیه ضایعات ماکروسکوپی ناشی از سویه‌های استاندارد ویروس گامبورو می‌باشد، البته در پاساژ سوم تنوع و تعداد ضایعات ماکروسکوپی کاهش یافته که توضیح خاصی در این رابطه نمی‌توان داد، همچنین چون تفاوت خاصی بین ضایعات ایجاد شده توسط نمونه‌های بورس و طحال مشاهده نگردید، لذا می‌توان هر یک از ارگانها را جهت جداسازی ویروس گامبورو استفاده نمود ولی با توجه به فراوانی ضایعات حاصله از بورس‌های تلقیحی استفاده از بورس فابریسیوس برای جداسازی ویروسی گامبورو اولیویت دارد (۲۵). در پاساژ سوم بورس‌های آلوده در کشت سلول ویروس گامبورو تغییرات سلولی کمی مشاهده گردید ولی CPE مشخص ویروس گامبورو که شامل دانه‌دار شدن سیتوپلاسم بویژه در اطراف هسته، گرد شدن و کنده شدن سلولها می‌باشد مشاهده نشد (۲۳، ۲۴). در این رابطه چند حالت متصور می‌باشد. اول اینکه نمونه‌های تلقیحی (بورس و طحال) آلوده به ویروس گامبورو نبوده‌اند که با توجه به نتایج حاصل از تلقیح تخم مرغهای SPF و مشاهده ویروس گامبورو و در عکسهای میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از کشت سلولهای فیبروبلاست تلقیح شده، مؤید این

احتمال نمی‌باشد. دوم اینکه نوع سلول انتخابی جهت کشت مناسب نبوده یا تعداد پاساژها کم بوده است که متداول ترین روش برای رشد و تکثیر ویروس گامبورو استفاده از فیبروبلاست جنین ماکیان به صورت ۳ پاساژ متوالی می‌باشد در نتیجه این احتمال نیز منتفی است (۳، ۴، ۲۲ و ۲۸). سوم اینکه جداسازی و تکثیر ویروس مزرعه گامبورو از طریق کشت سلولی به علت اینکه معمولاً این ویروس به سختی به کشت سلول عادت می‌نماید کار مشکلی می‌باشد، احتمالاً در این بررسی حالت سوم توضیح داده شده در عدم موفقیت کشت ویروس گامبورو در CEF دخیل بوده است چرا که مشخص شده است که تمامی ویروس‌های گامبورو نمی‌توانند در کشت سلول رشد و تکثیر پیدا کنند و بعضی از سویه‌ها ویروس گامبورو روی تخم‌مرغ جنین‌دار یا لئوسیت‌های B رشد و تکثیر می‌یابند ولی به سلولهای فیبروبلاست جنین ماکیان به آسانی عادت نمی‌کنند (۱۷).

آزمایش رسوب در ژل یکی از روشهایی است که برای تشخیص آنتی بادی‌های ضد ویروس گامبورو مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱، ۶، ۲۰، ۲۱ و ۳۱). در این بررسی از آزمایش رسوب در ژل فقط به عنوان یک آزمایش اولیه به منظور حصول اطمینان از شناسایی پادکن (ویروس گامبورو) و پادتن (سرم مثبت) و ایجاد کمپلکس پادکن - پادتن و تشکیل خط رسوبی استفاده گردید یعنی در ابتدا سرم مثبت تهیه شده در مقابل پادکن شناخته شده (ویروس استاندارد



تصویر شماره ۲- خونریزی روی پرده کوربوآلاتونیک جنین تلقیح شده با ویروس گامبورو

پاوقی‌ها

- 1- Cytopathogenic
- 2- Chicken embryo fibroblast
- 3- Specific pathogen free
- 4- Agar gell precipitation

منابع مورد استفاده

- 1- Aghakhan, S.M., Fereidouni, S.R., Abshar, N., Marunesi, C., and Sami, Z. 1996. Characterization of a highly virulent infectious bursal disease virus. Archives de L'Institute Razi, 46/47: 55-63.
- 2- Aghakhan, S.M., Abshar, N., Rasoul Nejad Fereidouni, S., Marunesi, C. and L'Institute Razi, 44/45: 1-10.
- 3- Chin, R.P., Yamamoto, R., Lin, Lin, W., Lam, K.M. and Farver, T.B. 1984. Serological survey of infectious bursal disease virus serotypes 1 and 2 in California turkeys, Avian Dis., 28: 1026-1036.
- 4- Confer A.W., Springer, W.T. Shane, S.M., and Conovan, J.F. 1981. Sequential mitogen stimulation of periphaeral blood lymphocytes from chickens inoculated with infectious bursal disease virus, Am. J. Vet. Res., 42: 2109-2113.

وجود دارد که ویروس گامبورو را با توجه به ۶ ضلعی بودن از رنوویروسها و وجود واحدهای ساختمانی ۴ تایی از آدنوویروسها و همچنین کوچکتر بودن اندازه‌اش نسبت به این ویروسها، از آنها می‌توان تفریق نمود (۱۷).

اگر چه بیماری گامبورو را می‌توان براساس روند ویژه تلفات در فرم بالینی بیماری، علائم کالبد گشایی و ضایعات هیستوپاتولوژیکی ایجاد شده در بورس فابریسیوس تشخیص داد ولی مسلماً جداسازی و شناسایی عامل بیماری را مطمئن‌ترین راه تشخیصی کلید بیماریها می‌باشد.

سیاسگزاری

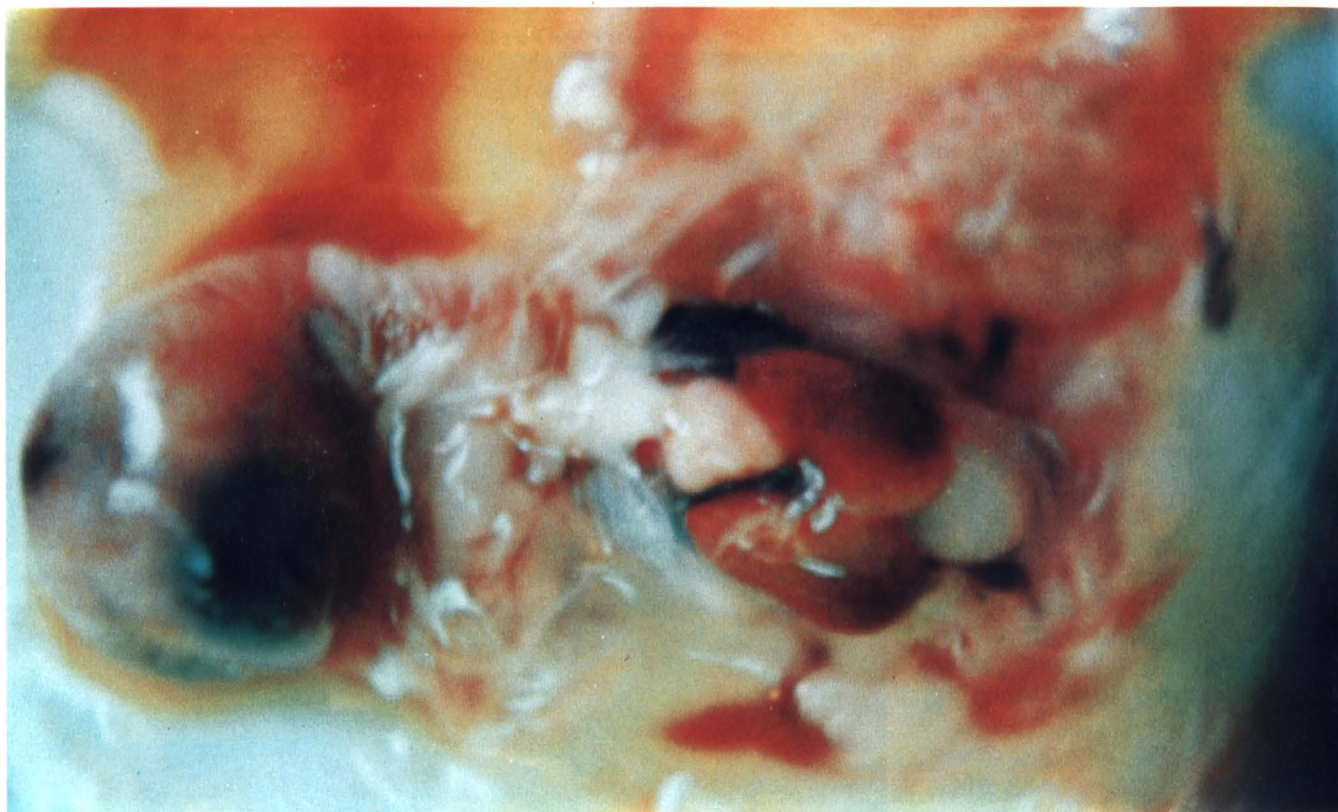
بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شیراز بخاطر فراهم نمودن امکانات و حمایت از طرح تحقیقاتی که مقاله حاضر بخشی از آن می‌باشد تشکر و قدردانی می‌گردد.

گامبورو سویه، S706) آزمایش گردید و پس از مشاهده خط رسوبی (که نشان دهنده شناسای ویروس گامبورو توسط سرم مثبت می‌باشد) از این سرم مثبت برای شناسایی ویروس گامبورو در صلایه جنینها SPF تلقیح شده و بورسهای عفونی استفاده شد. با توجه به ایجاد خط رسوبی مشابه (تصویر شماره ۵) بین سرم مثبت و نمونه‌ها می‌توان اظهار نمود که نمونه‌ها حاوی ویروس گامبورو بوده‌اند.

در عکسهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در این بررسی، شکل و اندازه ذرات ویروسی مشاهده شده، مشابه ویروس گامبورو می‌باشد ولی واحدهای ساختمانی ۴ تایی (کپسومرها) به علت عدم وضوح کافی در درشت نمایی بالا مشاهده نگردید. خاطر نشان می‌گردد که هنگام استفاده از نمونه‌های بورس احتمال آلودگی این ارگان به آدنوویروسها و رنوویروسها

جدول شماره ۱- ضایعات ماکروسکوپی مشاهده شده در اثر تلقیح ویروس گامبورو در تخم مرغهای SPF تلقیح شده.

ضایعات ماکروسکوپی							
نمونه تلقیح شده	پاساز	تخم مرغهای تلقیح شده	جنین تلف شده	قلب نیم‌پخته	نکروز کبدی	خونریزی روی پرده کوربوآلاتونیک	خونریزی روی پوست
صلایه بورس	اول	۴	۱	۱	-	۱	۱
صلایه بورس	دوم	۴	۲	۲	۲	-	-
صلایه بورس	سوم	۴	-	-	-	-	۲
صلایه طحال	اول	۴	۱	۱	-	-	۱
صلایه طحال	دوم	۴	۱	-	۲	-	-
صلایه طحال	سوم	۴	-	-	-	۱	۱



تصویر شماره ۳- حالت نیم بخته بودن قلب جنین تلقیح شده با ویروس گامبورو

- 17- McFerran, J.B., McNulty, M.S. and Curran, W.L. 1978. Diagnosis of avian viral diseases by electron microscopy, *Am. J. Vet. Res.*, 39: 505-508.
- 18- McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Conner, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S. and Allen, G.M. 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys, and ducks: demonstration of a second serotype, *Avian Pathol.*, 9: 395-404.
- 19- McNulty, M.S., Curran, W.L., Todd, D. and McFerran, J.B. 1979. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy, *Avian Pathol.*, 8: 239-247.
- 20- Nakai, T. and Hirai, K. 1981. In vitro infection of fractionated chicken lymphocytes by infectious bursal disease virus, *Avian Dis.*, 25: 831-838.
- 21- Nakamura, T., Otaki, Y., Lin, Z., and Kato, A. 1993. Rapid and quantitative assay system for measuring anti-infectious bursal disease virus antibody using monoclonal antibody bound to polystyrene latex microspheres, *Avian Dis.*, 37: 786-792.
- 22- Nicholas, R.A.J., Reed, N.E., Wood, 12- Kaufer, I. and Weiss, E. 1980. Significance of bursa of fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens, *Infect. Immun.*, 27: 364-367.
- 13- Keck, L.D., Skeeles, J.K. and McNew, R.W. 1993. Antibody detection in matched chicken sera and egg-yolk samples by commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus, infectious bursal disease virus, and avian reovirus, *Avian Dis.*, 37: 825-828.
- 14- Kibenge, F.S.B., Dhillon, A.S. and Russel, R.G. 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus, *J. Gen. Virol.*, 69: 1757-1775.
- 15- Lukert, P.D. and Davis, R.B. 1974. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures, *Avian Dis.*, 18: 243-250.
- 16- Lukert, P.D. and Saif, Y.M. 1991. Infectious bursal disease, in: *Diseases of poultry*, 9th ed., Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M. and Yord, Jr, H. W. Iowa State University Press, Ames, Iowa. PP. 648-663.
- 5- Cosgrove, A.S. 1962. An apparently new disease of chicken, avian nephrosis, *Avian Dis.* 6: 385-389.
- 6- Cullen, G.A. and Wyet, H.P.J. 1975. Quantitation of antibodies to infectious bursal disease, *Vet. Rec.*, 97: 315.
- 7- Hirai, K. and Calnek, B.W. 1979. In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes, *Infect. Immun.*, 25: 964-970.
- 8- Hitchner, S.B. 1970. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs, *Poultry Sci.*, 49:511-516.
- 9- Jackwood, D.H., Saif, M.Y. and Hughes, J.H. 1982. Characteristics and serological studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys, *Avian Dis.*, 26: 871-882.
- 10- Jackwood D.H., Saif, M.Y. and Hughes, J.H. 1987. Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines, *Avian Dis.*, 31: 370-375.
- 11- Jordan, F.T.W. 1990. *Poultry Dis.*, 3rd ed., Bailliere. Tindall, London P. 177-181.

G.W., Hebert, C.N., Muskett, J.C. and Thornton, D.H., 1985. Detection of antibodies against infectious bursal disease virus: A comparison of three serological methods, Res. Vet. Sci., 38: 198-192.

23- Nusbaum, K.E., Lukert, P.D. and Fletcher, O.J. 1988. Experimental infections of one-day-old poult with turkey isolates of infectious bursal disease virus, Avian Dis., 17: 51-62.

24- Petek, M., D'Aprile, P.N. and Cancellotti, F., 1973. Biological and physicochemical properties of the infectious bursal disease virus (IBDV). Avian Pathol., 2: 135-152.

25- Rosenberger, J.K. 1989. Infectious bursal disease, in isolation and identification of avian pathogens. 3rd ed., Purchase, H.G., Pomermuth, C.H. and Williams, J.E. Kendal-Hunt publishing Company. Ames, Iowa. PP. 165-166.

26- Shirai, J., Seki, R., Kamimura, R. and Mitsubayashi, S. 1994. Effects of invert soap with 0.05% sodium hydroxide on infectious bursal disease virus, Avian Dis., 38: 240-243.

27- Singh, K.C.P., 1992. Growth of different strains of infectious bursal disease virus in cell culture. Ind. J. Virol., 8: 15-17.

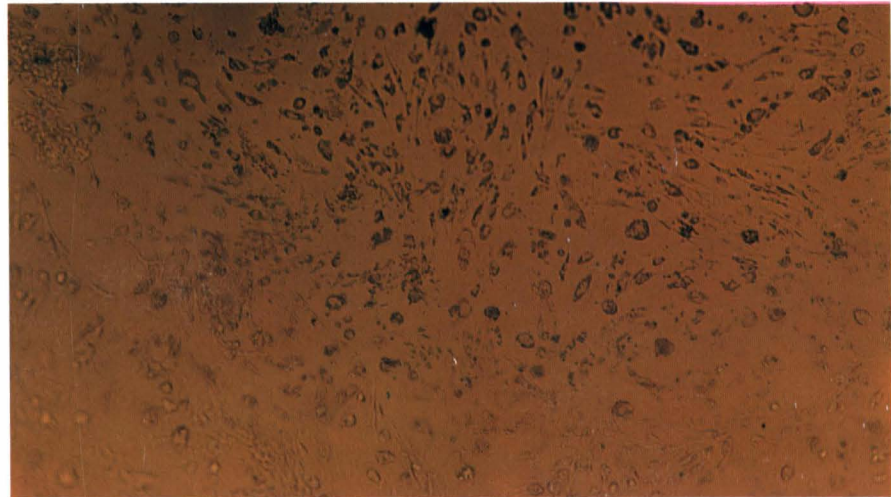
28- Sivanandan, V. and Maheswaran, S.K. 1981. Immune profile of infectious bursal disease: III. Effect of infectious bursal disease virus on the lymphocyte responses to phytohemagglutinin and on mixed lymphocyte reaction of chickens, Avian Dis., 25: 112-120.

29- Skeel, J.K., Lukert, P.D., De Buysscher, E.V., Fletcher, O.J. and Brown, J., 1979. Infectious bursal disease viral infection. II. The relationship of age, complement levels, virus-neutralizing antibody, clotting, and lesions, Avian Dis., 23: 107-116.

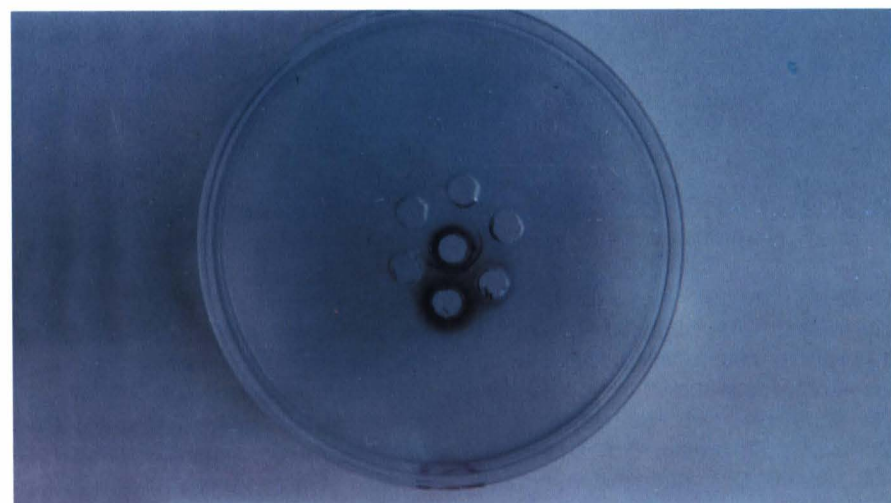
30- Skeel, J.K., Slavik, M., Beasley, J.N., Brown, A.H., Meinecke, C.F., Maruca, S. and Welch, S., 1980. An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus, Am. J. Vet. Res., 41: 1458-1461.

31- Vakharia, V.N., Snyder, D.B., He, J., Savage, E.G.H. and Mengel-Wheat, S.A. 1993. Infectious baculovirus recombinant confer protection in chickens, J. Gen. Virol., 74: 1201-1206.

تصویر شماره ۴- سلولهای فیبروبلاست تغییر شکل یافته، سه روز پس از تلقیح ویروس گامبورو



تصویر شماره ۵- آزمایش رسوب در ژل، حفره مرکزی سرم مثبت و حفره کناری پادکن (صلایه بورسهای عفونی)



تصویر شماره ۶- ویروس گامبورو جدا شده در بورس فابرسیوس آلوده (درشت نمایی ۴۹۵×۱۰۰ نانومتر = میله)

