

کاربرد PCR در تشخیص ویروس عامل بیماری مارک طیور (MDV)

صادق ربیعی^{۱,۳*}، سعادت مشکلانی^{۱,۲}، عباس دوستی^۱، محمد جواهری کوپایی^{۱,۳}، علی رضا مجلسی^۱

۱- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

۲- انجمن علمی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

۳- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

*نویسنده مسئول: Moshkelanii@yahoo.com

دریافت مقاله: ۲۰ شهریور ۸۹، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۸۹

Diagnosis of Marek's disease virus (MDV) by PCR

Rabiei, S.^{1,3*}, Moshkelani, S.^{1,2}, Doosti, A.¹, Javaheri-Koupaei, M.^{1,3}, Majlesi, A.¹

¹Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord- Iran.

²Veterinary Academic Association, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord- Iran.

³Young Researchers Club, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord- Iran.

Abstract

Marek's disease (MD) is a viral disease caused by the penetration and proliferation of lymphoid cells in parietal nerves and some other organs of birds and in fact as is considered, one of the ordinary and important infectious diseases in poultry. MD viruses cause immunosuppression and predispose poultry to other infectious diseases. The purpose of this study was diagnosis of Marek's disease virus as one of the causative agents for visceral tumors in chickens using PCR. In order to perform this study, tumoral tissue sampling was collected from slaughter houses of Chaharmahal & Bakhtiari province. After DNA extraction from samples, Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using specific primers detecting 132bp tandem repeat and antigen A gene of MDV. Finally electrophoresis of PCR products was done on 1.5% agarose gel. The results showed that 62.86% of the total 280 nodul skin samples, tested for the presence of A genes of mark's disease, were positive. In 40% of samples, 132 bp tandem repeat was also indentified. Since all the samples were tested have clinical symptoms of Marek's disease, but the diagnosis of 62.86 percent infection based on PCR, it seems to be that other factors, except the MDV, have a role in tumor lesions in poultry. *J. Vet. Microbiol.* 7,1:35-39, 2011.

Keywords: Marek's disease virus, PCR, Chicken, Prevalence.

چکیده

بیماری مارک (MD) یک بیماری ویروسی است که در اثر نفوذ و تکثیر سلولهای لنفوئید در اعصاب سطحی و برخی اندامهای دیگر در پرندگان بزرگ می‌کند و در واقع یکی از بیماری‌های واگیر متداول و مهم طیور محسوب می‌شود. این ویروس با تضعیف سیستم ایمنی، باعث مستعد شدن طیور در مقابل دیگر بیماری‌ها می‌شود. هدف از این مطالعه تشخیص ویروس عامل بیماری مارک به عنوان یکی از عوامل ویروسی تومورزا در طیور با استفاده از واکنش PCR می‌باشد. به منظور تشخیص و ردیابی ویروس مارک، نمونه‌های بافت توموری از کشتارگاه‌های طیور استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن A و پرایمرهای ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده ویروس MDV انجام شد. سرانجام محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. نتایج نشان داد که ۶۲/۸۶ درصد از مجموع ۲۸۰ نمونه ندول پوستی مورد آزمایش، از لحاظ حضور ژن A ویروس مارک مثبت بودند. همچنین در ۴۰ درصد از نمونه‌ها نیز ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده تشخیص داده شد. از آنجاکه کلیه نمونه‌های مورد آزمایش دارای علائم بالینی آلودگی به مارک بودند، اما با توجه به تشخیص آلودگی ۶۲/۸۶ درصدی، به نظر می‌رسد عوامل دیگری به جز ویروس مارک نیز در ایجاد ضایعات توموری در طیور نقش دارند. مجله میکروبیولوژی دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۷، شماره ۱، ۳۹-۳۵.

واژه‌های کلیدی: ویروس بیماری مارک، PCR، طیور گوشتی، شیوع.



مقدمه

بیماری مارک، یک بیماری لنفوپرولیفراتیو در طیور است که با ضایعات نئوپلاستیک در ارگان‌های مختلف مشخص می‌شود و عامل ایجاد کننده آن آلفا هرپس ویروس MDV می‌باشد (۸). این ویروس دارای سه سروتیپ یک، دو و سه می‌باشد که سروتیپ شماره یک خصوصیات بیماری‌زایی بیشتری از خود بروز می‌دهد و دو سروتیپ دیگر به خصوص سروتیپ سه در اغلب موارد غیر بیماری‌زا است (۳).

به علت اینکه علائم عصبی و فلجی، عمده ترین تظاهرات آشکار این بیماری می‌باشد، به آن لنفوماتوز عصبی نیز می‌گویند. این بیماری مختص ماکیان است ولی گاهی در بلدرچین و بوقلمون‌ها نیز دیده می‌شود (۴).

از جمله علائم کلینیکی این بیماری می‌توان به تضعیف سیستم ایمنی، التهاب اعصاب محیطی و عقده‌های لنفاوی، ژولیدگی پرها، رنگ پریدگی تاج، ریش و ملتحمه و کم خون بودن بدن اشاره کرد. همچنین از نشانه‌های فرم کلاسیک بیماری عدم تعادل و تطابق در حرکت و فلجی در پاها قابل ذکر است (۱۱).

علائم ماکروسکوپیکی بیماری شامل تورم فولیکول‌های پر، مشاهده نقاط خونریزی در ساق پا، تومور عضلات مخطط و بزرگ شدن امحاء و احشاء و... می‌باشد. در اثر آلودگی گله‌های طیور به سروتیپ شماره ۱ یک این ویروس، گله‌ها متحمل تلفات قابل توجهی می‌شوند (۶).

جهت پیشگیری از این بیماری می‌توان از واکسن‌های زنده یا تخفیف حدت یافته مشتق شده از سروتیپ‌های دو و سه استفاده نمود. جهت تشخیص این بیماری از روش‌های ELISA و AGID که شامل مراحل جداسازی ویروس، شناسایی آنتی ژن و ارزیابی پادتن ضد MDV است، استفاده می‌شود (۷).

البته این روش‌ها برای تشخیص دقیق و قطعی این بیماری و همچنین تشخیص سویه‌ها از همدیگر به اندازه کافی حساس و اختصاصی نیستند. بنابراین برای تشخیص دقیق بیماری و همچنین تعیین هویت سویه‌ها می‌توان از روش‌های مولکولی استفاده کرد (۱۰ و ۵).

هدف از انجام این تحقیق تنظیم روش PCR به عنوان روش دقیق جهت شناسایی عامل ویروسی - عفونی مارک در طیور و همچنین بررسی میزان نقش ویروس مارک در ایجاد تومور پوستی در طیور گوشتی استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد.

مواد و روش کار

جهت انجام این مطالعه تعداد ۲۸۰ نمونه بافت تومور پوستی از طیور گوشتی مشکوک و دارای علائم بالینی از کشتارگاه‌های طیور سطح استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. واکسن دوگانه HVT-Rispens نیز برای مقایسه با نمونه‌ها و همچنین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به منظور استخراج DNA برای تنظیم واکنش PCR، از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن (DNPTM KIT) بهره گرفته شد و مراحل استخراج مطابق دستورالعمل ارائه شده همراه کیت مذکور انجام پذیرفت. واکنش PCR به منظور بررسی حضور DNA ژنومی ویروس مارک، با استفاده از دو زوج آغازگر صورت پذیرفت.

یک زوج مشخص کننده ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده در سروتیپ ۱ که ردیف نوکلئوتیدی آن به صورت زیر است (۹):
TACTTCCTATATAGATTGAGACGT-3':F-'۵'
GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA-3':R-'۵'
و زوج دیگر مشخص کننده ژن A سروتیپ یک می‌باشد که

توالی نوکلئوتیدی آن عبارت است از (۹):
GAGGTACCTCATGGACGTTCCACA-3':F-'۵'
ACATTCTTTTCGTTGGCGTGGTAT-3':R-'۵'
واکنشگرهای مربوط به PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با هم مخلوط گردیدند. این مخلوط شامل ۲/۵ میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰ میکرومول Mix dNTP، ۵/۱ میکرومول MgCl_۲ و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase که همگی از شرکت سیناژن ایران تهیه شده‌اند، می‌باشد. سپس ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، به مخلوط واکنش PCR اضافه گردید. در هر یک از مراحل انجام آزمایش، شاهد مثبت و منفی به کار گرفته شد. شاهد مثبت شامل DNA ژنومی تخلیص شده از واکسن دوگانه HVT-Rispens بوده و شاهد منفی میکروتیوپی است که شامل کلیه واکنشگرهای PCR به جز DNA می‌باشد و به جای DNA مقدار ۲ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده گردید.

همچنین برنامه دمایی واکنش PCR برای کلیه پرایمرهای مورد اشاره در بالا، به ترتیب شامل یک مرحله به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه



قطعه ۴۳۴ جفت بازی می باشد. از بین ۲۸۰ نمونه مورد بررسی، تعداد ۱۱۲ مورد قطعه ۴۳۴ جفت بازی را داشته و از لحاظ آلودگی به سروتیپ ۱ ویروس مارک، مثبت تشخیص داده شدند. نمونه‌هایی که با آغازگرهای شناساگر ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده، از لحاظ بیماری مارک مثبت شدند، همگی در محدوده نمونه‌هایی بودند که با آغازگرهای مربوط به ژن A نیز، مثبت بودند.

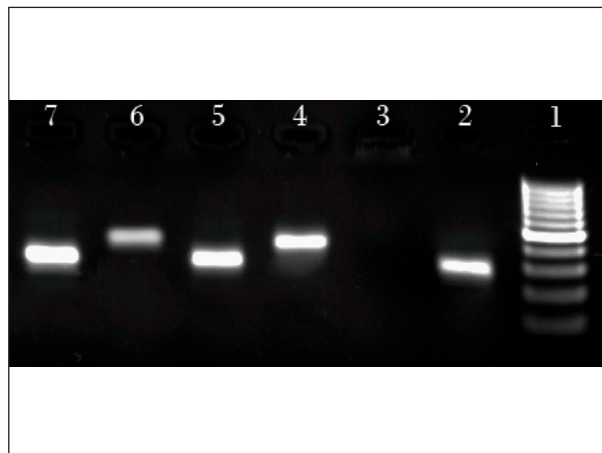
شماره ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاز می باشد. شماره ۲ کنترل مثبت بوده که مربوط به تکثیر ژن A در سویه واکسن HVT-Rispens است. شماره ۳ کنترل منفی، بدون DNA می باشد. شماره‌های ۴ و ۶ مربوط به نمونه‌های آلوده به ویروس مارک بیماریزا بوده و شماره‌های ۵ و ۷ نشان دهنده حضور ژن A در نمونه‌های مورد آزمایش می باشد.

بحث و نتیجه گیری

بیماری مارک یکی از عوامل ایجاد کننده ضایعات توموری در طیور می باشد. عامل این بیماری هرپس ویروس است که بسیار مسری بوده و در اکثر مرغداری‌ها وجود دارد. مرغها حتی بعد از واکسیناسیون اگر با سویه حاد ویروس مواجه شوند، می توانند تا آخر عمر آزرانگاه دارند.

یک نوع از آغازگرهای معمول جهت تشخیص بیماری مارک که مورد استفاده قرار می گیرد، شناساگر ژن A می باشد. آنتی ژن A یک آنتی ژن ترشحی بوده که در مایع روی کشت سلول عفونت یافته به این ویروس قابل مشاهده می باشد. اندازه باند حاصل از عملکرد این آغازگرها، ۳۱۴ جفت باز می باشد. آغازگر استفاده شده دیگر، آغازگر شناساگر ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده می باشد. بدان دلیل به آن ردیف تکرار شونده می گویند که در سویه‌های مختلف سروتیپ ۱ به تعداد مختلفی تکرار می شود. یعنی می تواند یک تا نه نسخه از آن در این سروتیپ تکرار شود و بسته به تعداد دفعات تکرار آن، میزان بیماریزایی ویروس MDV افزایش می یابد (۷).

همانطور که نتایج نشان می دهد، در بررسی اولیه با آغازگرهای مخصوص شناسایی ژن A، ۸۶/۶۲ درصد از مجموع ۲۸۰ نمونه فولیکول پوستی متورم مورد آزمایش، به ویروس بیماری مارک آلوده بودند. برخی محققین معتقدند، ویروس‌های مارک تخفیف حدت یافته، در اثر پاساژهای متوالی ژن A خود را از دست داده و لذا هر ویروسی که طی واکنش



شکل ۱- واکنش PCR برای ژنهای A و ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده ویروس مارک.

سانتی گراد ۱ دقیقه، ۵۷ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه تنظیم شد.

جهت بررسی تکثیر احتمالی قطعات هدف در واکنشهای مذکور، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR با loading buffer مخلوط گردیده و در کنار یک مارکر مناسب در ژل آگارز ۵/۱ درصد با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید، الکتروفورز گردید. پس از گذشت مدت زمان لازم جهت به حرکت در آمدن محصولات PCR، ژل مورد نظر با دستگاه ترانس لومیناتور زیر نور ماوراء بنفش بررسی و نتایج مشاهده و ثبت گردید.

نتایج

کیفیت و کمیت DNA های استخراج شده به روشهای اسپکتروفتومتری و همچنین پس از الکتروفورز روی ژل آگارز، مشاهده و مورد تایید قرار گرفت و برای انجام PCR مناسب تشخیص داده شد. پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز طبق شرایط ذکر شده در بخش مواد و روش ها و الکتروفورز نمونه‌ها نتایج مورد نظر بدست آمد.

از ۲۸۰ نمونه بافت تومور پوستی مورد مطالعه ۱۷۶ عدد دارای بانندی به اندازه ۳۱۴ جفت باز بودند که نشان دهنده حضور ژن A در این نمونه‌ها می باشد. از طرفی همانطور که در شکل ۱ مشخص شده است نتایج PCR بر روی واکسن دوگانه HVT-Rispens- نیز وجود این باندر را به دلیل وجود سروتیپ‌های تخفیف حدت یافته، تایید می کند. در بخش دوم تحقیق واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای شناساگر ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده صورت پذیرفت. نتایج این مرحله نشان دهنده تکثیر



از آنجا که مطابق اظهارات مسئولین امر، هیچگونه واکنشی علیه بیماری مارک در مراکز پرورش طیور گوشتی بکار نمی رود و واکنش مارک که شامل ویروس زنده و تخفیف حدت یافته می باشد، تنها در مراکز نگهداری مرغ مادر و تخمگذار مورد مصرف قرار می گیرد، لذا به نظر می رسد کلیه نمونه های مثبت از لحاظ آلودگی به ویروس مارک، در واقع مبتلا به سویه غیر واکنش اعم از بیماریزا و غیر بیماریزا بوده که این موضوع خود نیازمند توجه بیشتر مسئولین عرصه دامپزشکی و دامپروری می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تقدیر و تشکر به عمل می آید.

منابع

1. Becker, Y., Asher, Y., Tobar, E., Davidson, I., Malkinson, M., Weisman, Y (1992) Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease virus (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotype 2 and 3. *Journal of Virological Methods*, **40**: 307-322.
2. Kozdrun, W., Samorek-Salamonowicz, E., Czekay, H. (2001) Polymerase chain reaction for the differentiation of Marek's disease virus strains. *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, **45**: 5-10.
3. Lee, L. F., Wu, P., Sui, D., Ren, D., Kamil, J., Kung, H. J., Witter, R. L. (2000) The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 6091-6096.
4. Levy, A., Gilad, O., Xia, L., Izumiya, Y., Choi, J., Tsalenko, A., Yakhini, Z., Witter, R. L., Lee, Kung H. (2005) Marek's disease virus Meq transforms chicken cells via the v-Jun transcriptional cascade: A converging transforming pathway for avian oncoviruses. *The National Academy of Sciences of the USA*, **102** (41): 14831-14836.
5. Liu, J. L., Kung H. J. (2000) Marek's disease herpesvirus transforming protein MEQ: a c-Jun

PCR، نسبت به حضور این ژن مثبت باشد، بیماریزا است. در صورتی که Becker و همکاران در سال ۱۹۹۲ در پی تحقیقات عملی نشان دادند که در کلیه سویه های بیماریزا و غیر بیماریزای هرپس ویروس عامل بیماری مارک، ژن A وجود دارد (۱۳). در تحقیق حاضر از واکنش دوگانه HVT-Rispens که یک سویه تضعیف شده می باشد، به عنوان کنترل مثبت بهره گرفته شد و نتایج نشان داد که در واکنش PCR، قطعه ۳۱۴ جفت بازی مربوط به ژن A تکثیر می گردد که با نتایج تحقیق Becker و همکاران مطابقت دارد.

در مرحله دوم از این تحقیق، کلیه نمونه ها تحت آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای شناساگر ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده، قرار گرفتند که ۴۰ درصد از ۲۸۰ نمونه مورد بررسی از لحاظ وجود این ژن، مثبت بودند. در این مطالعه، با کاربرد پرایمرهای شناساگر ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده روی ژنوم واکنش دوگانه HVT-Rispens در واکنش PCR، هیچگونه باند مشخصی حاصل نگردید که نشان دهنده عدم حضور این ژن در سویه های غیر بیماریزا می باشد. NurdzoK همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز عدم حضور ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده را در سویه های تخفیف حدت و سویه واکنش اثبات نمودند (۲).

از آنجا که در این تحقیق از نمونه های بافت تومور پوستی طیور گوشتی مشکوک و دارای علائم بالینی برای انجام آزمایشات استفاده شد، تنها ۶۲/۸۶ درصد نسبت به مارک آلوده بودند و بقیه نمونه ها با وجود نشان دادن علائم بالینی فاقد ویروس مارک بودند. لذا به نظر می رسد علاوه بر ویروس بیماری مارک، عوامل دیگری نیز در ایران باعث ایجاد ضایعات توموری در طیور می شوند.

موفقیت برنامه های کنترل بیماری مارک در طیور، نیاز به وجود یک روش تشخیصی سریع و دقیق دارد که بتوان بوسیله آن پرندگانی را که ناقل این عامل هستند و آن را در محیط پراکنده می کنند، تشخیص داده و کنترل نمود. هر چند روش های گوناگونی برای تشخیص ویروس مارک در طیور ابداع گردیده اما بکارگیری بسیاری از این تکنیک ها مستلزم صرف وقت و هزینه های گزافی می باشد. در این تحقیق سعی شده تا با تشخیص سریع این عامل بیماریزا در طیور توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز، نسبت به کنترل و پیشگیری از این بیماری اقدامات موثرتری انجام پذیرد.



- analogue with an alternative life style. *Virus Genes*, **21**: 51-64.
6. Parcels, M. S., Arumugaswami, V., Prigge, J. T., Pandya, K., Dienglewicz, R. L. (2003) Marek's Disease Virus Reactivation from Latency: Changes in Gene Expression at the Origin of Replication. *Poultry Science Association*, **82**: 893-898.
 7. Silva, F. (1992) Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. *Avian Diseases*, **36**: 521-528.
 8. Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Rock, D. L., Kutish, G. F. (2000) The genome of a very virulent Marek's disease virus. *Journal of Virology*, **74**: 7980-7988.
 9. Vathsala, M., Kumanan, K., Saravanabhava, K., Gunaseelan, L. (2001) Diagnosis of Marek's disease virus (MDV) in commercial chickens by Slot-Blot hybridization using PCR based MDV-1 antigen a gene probe. *Online Journal of Immunology*, **1**: 36-48.
 10. Venugopal, K. (2000) Marek's disease: an update on oncogenic mechanisms and control. *Research in Veterinary Science*, **69**: 17-23.
 11. Zekarias, B., Huurne, A. H., Landman, W., Rebel, J. M., Pol, J. M., Gruys, E. (2002) Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Veterinary Research*, **33**: 109-125.

