Archive of SID

تشخیص مولکولی ویروس عامل بیماری مارک در ایران

دکتر علی محمدی[1]* دکتر هادی کیوانفر[2] دکتر فرهید همت زاده[2] دکتر محمدحسن بزرگمهری فرد[3]

دریافت مقاله: ۳۰ دی‌ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۳۰ خردادماه ۱۳۸۳

هدف: هدف از این مطالعه تشخیص ویروس عامل بیماری مارک (MDV) به عنوان یکی از عوامل ویروسی تومورزا در احشای طیور با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرازبود.

نمونه‌ها: تعداد چهل نمونه خون از طیورتخمگذار ۱۹ هفته فاقد علائم و ۴۲ نمونه بافت توموری از طیور تجا ی اخذگردید.

روش: ابتدا استخراج DNA از نمونه‌های بافتی و خون به روش سیلیکا ژل انجام گرفت. سپس آزمون PCR با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی یک ردیف ۱۳۲bp و ژن A صورت پذیرفت وسرانجام، الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱درصد انجام‌شد.

نتایج: در نمونه‌های خون هیچ مورد مثبتی از ویروس بیماریزای مارک وحتی‌سوش واکسینال مشاهده نشد، اما در ۴۷/۶درصد از نمونه‌های بافتی، اسید نوکلئیک ویروس مارک مورد تشخیص قرارگرفت. این تومورها در اعضایی نظیر کبد، طحال، پیش معده، تخمدان، عضله‌سینه وبورس فابریسیوس موجود بودند.

نتیجه‌گیری: ویروس واکسن ویرمی کوتاه مدتی داشته و در نمونه‌گیریهای معمول، نمی توان ویروس واکسن را در خون طیور جستجو کرد، حتی در مورد ویروسهای بیماریزای مارک نیزمی توان‌گفت که تنها در دوره محدودی پس از ورود ویروس به بدن، می توان‌آنها را در خون ردیابی نمود. در هر حال، ویروس‌سروتیپ شماره ۱ مارک به عنوان یکی از عوامل تومورزا و ایجاد بیماری درگله‌های طیور ایران برای اولین بار مورد تشخیص قرارگرفت. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۲، ۱۳۰-۱۲۵.

واژه‌های کلیدی: ویروس بیماری مارک، PCR، طیور.

در سال ۱۹۶۷ هرپس ویروس اختصاصی عامل بیماری مارک (Mareks Disease Virus) یا MDV توسط Churchil و Biggs (۵) جدا و مشخص شد، هرچند که بیماری در ابتدا در سال ۱۹۰۷ توسط Josef Marek (۸)، دامپزشک مجارستانی توصیف شده بود. بیماری مارک، یک بیماری لنفوپرولیفراتیو طیور است که با ضایعات نئوپلاستیک در ارگانهای مختلف مشخص می‌شود. ویروس عامل این بیماری، یک آلفا هرپس ویروس است که به سه سروتیپ تقسیم می شود. سروتیپ ۱ که شامل سویه‌های تومورزا و واریانتهای تخفیف حدت یافته آنها است. تیپهای بیماریزا یا پاتوتیپهای (Pathotypes) این سروتیپ به سه

۱) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز -شیراز -ایران.
۲) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران -تهران -ایران.
۳) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران -تهران -ایران.
*) نویسنده مسؤول: msmohamadi@yahoo.com

Molecular diagnosis of Marek's disease virus (MDV) in Iran

Mohammadi, A.,[1] Keyvanfar, H.,[2] Hemmatzadeh, F.,[2] Bozorgmehri Fard, M.H.[3]

[1]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, of Shiraz, Shiraz-Iran. [2]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.[3]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

Objective: The purpose of this study was diagnosis of Marek's disease virus as one of the causative agents for visceral tumors in chickens using Polymerase Chain Reaction.

Samples: Forty blood samples from the chickens without any clinical signs of Marek's disease and another 42 tumoral tissues from commercial chickens were collected.

Procedure: The whole DNA of the samples were extracted using a silica gel DNA extraction kit, then PCR test was performed using specific primers detecting 132bp tandem repeat and antigen A gene of MDV, finally electrophoresis of PCR products was done in 1ko¾l agarose gel.

Results: No positive results were obtained in blood samples for MDV and it's vaccinal strain, but about 47.6% of samples were positive. The tumoral tissues including liver, spleen, proventriculus, ovary, breast muscle and bursa of Fabricius.

Conclusion: The vaccinal strain of MDV (Rispens) was not detected in any of examined blood samples, as the period of viremia for this virus is very short. Serotype 1 of Marek's disease virus was detected as a causative agent of tumors in the chicken farms of Iran as a first step in this study.

J.Fac.Vet.Med.Univ.Tehran. 60,2:125-130,2005.

Key words: Marek's disease virus, PCR, Chicken.

Corresponding author's email:msmohamadi@yahoo.com

دسته بسیار حاد، حاد و ملایم تقسیم می‌شوند که همه اینها توانایی ایجاد بیماری را به درجات مختلف دارند(۴)، سروتیپ ۲ که به‌طور طبیعی غیر بیماریزا بوده و سروتیپ ۳ که هرپس ویروس غیربیماریزای بوقلمون(HVT) است. جهت پیشگیری از این بیماری، می توان از واکسنهای زنده که یا تخفیف حدت یافته هستند و یا از نوع هترولوگ، یعنی سروتیپهای ۲ و ۳، استفاده نمود(۲،۴،۷).

در ایران بیماری مارک از سالها پیش به شکل یک بیماری ضعیف کننده مبهم و عمومی، مانند کاهش تحرک و فعالیت، سستی، ضعف، بی حالی، بی‌اشتهایی و عدم تمایل به آب و غذا مشاهده شده است. ژولیدگی پرها و

www.SID.ir

Archive of SID

آلوده بودن آنها به مدفوع، رنگ پریدگی تاج، ریش و ملتحمه و گاهی آماسی بودن آنها و فضاهای بین انگشتی و همچنین نشانیهای فرم کلاسیک بصورت عدم تطابق در حرکت و فلجی پاها از دیگر علائم قابل مشاهده بودند. ضایعات ماکروسکوپیک بصورت تورم فولیکولهای پر، نقاط خونریزی در ساق پا، تومور عضلات مخطط اسکلتی، قطور شدن اعصاب محیطی، بزرگ شدن کبد، طحال، پیش معده، قلب، وجود کانونهای ندولر کوچک و بزرگ در روده‌ها، ابتلای تخمدان، بورس فابریسیوس، ریه، کلیه، غده فوق کلیه و لوزالمعده که درجاتی از افزایش اندازه را نشان می دادند خودنمایی کرده است(۱).

روشهای تشخیص بیماری مارک شامل جداسازی ویروس، شناسایی آنتی ژن و ارزیابی پادتن‌های ضد MDV با روشهای ELISA و AGID می‌باشند(۴). اما به دلیل وجود واکنشهای متقاطع در بین سروتیپهای گوناگون این ویروس، با روشهای یاد شده نمی توان بیماری مارک را به‌طور قطعی تشخیص داد. حتی پس از جدا سازی ویروس در کشت سلول فیبروبلاست جنین اردک، بدلیل خنثی شدن ویروسهای سروتیپ ۲ و ۳ بوسیله پادتنهای ضد سروتیپ ۱، تشخیص قطعی بیماری با مشکل مواجه می شود (۴،۷،۱۰). بنابراین تعیین هویت سویه‌های جدا شده فقط از طریق آزمونهای مولکولی انجام میشود و روشهای سرولوژیک مفید نیستند. آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز که در دهه ۸۰ بوسیله Mullis(۹) توسعه یافت، هم اکنون در تشخیص بیماریهای طیور، بخصوص بیماریهای ویروسی کاربرد وسیعی دارد و بهترین روش تشخیص بیماری مارک می باشد(۷).

یک نوع از آغازگرهای معمول جهت تشخیص بیماری مارک که در آزمون PCR مورد استفاده قرار می گیرد، شناساگر ژن A میباشد. آنتی ژن A یک آنتی ژن ترشحی بوده که در مایع روی کشت سلول عفونت یافته به MDV قابل نشان دادن است. اندازه باند حاصل از عملکرد این آغازگرها، ۳۱۴bp می‌باشد.

آغازگر معمول دیگری که جهت تشخیص این ویروس مورد استفاده قرار می گیرد، آغازگر شناساگر ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده است. ژنوم ۱۸۰ کیلوبازی ویروس مارک از دو قسمت اصلی تشکیل شده است: ۱- ردیف طویل واحد یا UL (Unique Long)، ۲- ردیف کوتاه واحد یا US (Unique Short). هر دوی این ردیفها، واجد دو قسمت احاطه کننده بنامهای TRL (Terminal Repeat Long)، IRL (Internal Repeat Long) که در دو طرف UL قرار گرفته‌اند و IRS (Internal Repeat Short)، TRS (Terminal Repeat Short) که در دو طرف US قرار دارند، هستند. ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده قسمتی از IRL را تشکیل می دهد (۱۰). بدان دلیل به آن ردیف تکرار شونده می‌گویند که در سویه‌های مختلف سروتیپ ۱ به تعداد مختلفی تکرار می‌شود. یعنی می تواند یک، دو، سه و حتی نه نسخه از آن در IRL موجود باشد. بسته به تعداد دفعات تکرار آن، می توان سویه‌های بیماریزا را از غیر بیماریزای MDV-1 تفریق نمود. در ویروسهای بیماریزای این سروتیپ، ردیف ۱۳۲bp تنها دو یا سه بار تکرار می شود یعنی می تواند یک، دو و یا سه نسخه از آن را داشته باشد، اما سویه‌های تخفیف حدت یافته MDV-1، واجد تعداد نسخه‌های بیشتری از ردیف ۱۳۲bp تا حدود نه نسخه از آن می باشند، لذا پس از انجام آزمون PCR، باندهای چندگانه در ژل آگارز مشاهده می شود که با توجه به وزن آنها، می توان دریافت که ژنوم ویروس موجود واجد چند نسخه از آن ردیف است و از آن پی به بیماریزا و یا غیر بیماریزا بودن ویروس موجود برد. هر چه تعداد تکرار بیشتر باشد، میزان بیماریزایی ویروس کمتر است(۳،۱۰). Zhu و همکاران در سال ۱۹۹۲(۱۲)، Becker و همکاران در سال ۱۹۹۲ و Kozdrun و همکاران در سال ۲۰۰۱ بهترین راه تشخیص افتراقی سویه‌های بیماریزا از غیر بیماریزای MDV-1 را استفاده از این آغازگر اعلام کردند(۳،۷). به طوری که همگی وجود یک باند قوی ۴۳۴ bp (۲×۱۳۲bp + ۱۷۰bp ردیف احاطه کننده) نشان دهنده دو کپی از ردیف ۱۳۲bp را در ویروسهای بیماریزای مارک، یک راه مطمئن برای تشخیص بیماری ذکر کردند و عدم وجود این باند و در عین حال وجود باندهایی که که نشان دهنده تعداد بیش از سه نسخه از ردیف مذکور می باشد، تائید کننده سویه‌های تخفیف حدت یافته موجود در سروتیپ یک ویروس مارک دانستند(۳،۷،۱۲). لازم به ذکر است که باندهای چندگانه اخیر، بسیار ضعیف بوده و برای شناسایی کامل آنها نیاز به آزمون PCR رادیواکتیو می باشد(۳).

در مطالعه حاضر با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، سعی در شناسایی قطعی ویروس عامل بیماری مارک درگله‌های طیور ایران شده است.

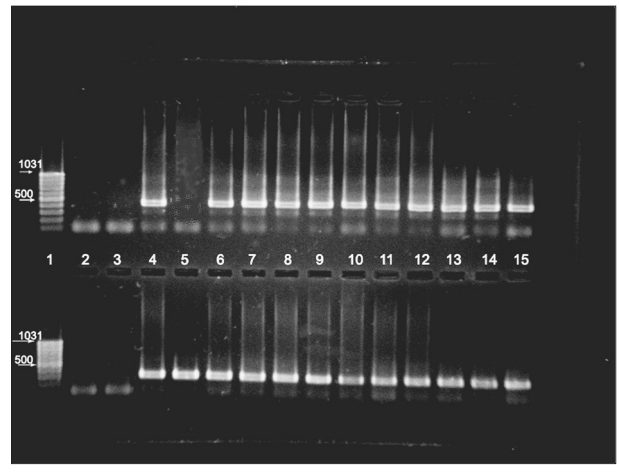
مواد و روش کار

نمونه‌های بافتی و واکسنها: جهت انجام این مطالعه تعداد ۴۰ نمونه خون از طیور تخمگذار ۱۹ هفته فاقد علائم و ۴۲ نمونه بافت توموری از ۴۰ پرنده تجاری جمع آوری گردید. واکسن دوگانه HVT-Rispens نیز برای مقایسه با نمونه‌های ناشناخته و همچنین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نمونه‌های بافتی پس از جمع آوری و تا قبل از جداسازی DNA، در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند، در حالی که از نمونه‌های خون سریعا" پس از جمع آوری، استخراج DNA صورت گرفت.

روش استخراج DNA از نمونه‌های خون: جهت انجام این کار از کیت تخلیص DNA ALL-IN-ONE ساخت شرکت BIOTOOLS استفاده شد. به ۵۰۰ µl از نمونه‌های خون، ۱cc بافر خون اضافه شد و پس از مخلوط کردن آنها، بمدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. مایع رویی حاصل از ۳ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰RPM دور ریخته شد و ۱cc بافر لیز کننده به محتویات، اضافه و پس از خوب مخلوط کردن آنها، بمدت ۲۰-۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. مایع رویی حاصل از ۵ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰RPM به یک لوله دیگر منتقل شد. جهت از بین بردن RNA در محلول حاصله، از ۵µl آنزیم RNase (۱۰mg/ml) بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده شد. سپس به این محلول، یک حجم محلول I و ۸۰µl ماتریکس سیلیکا اضافه شده و بخوبی مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای اطاق

www.SID.ir

Archive of SID

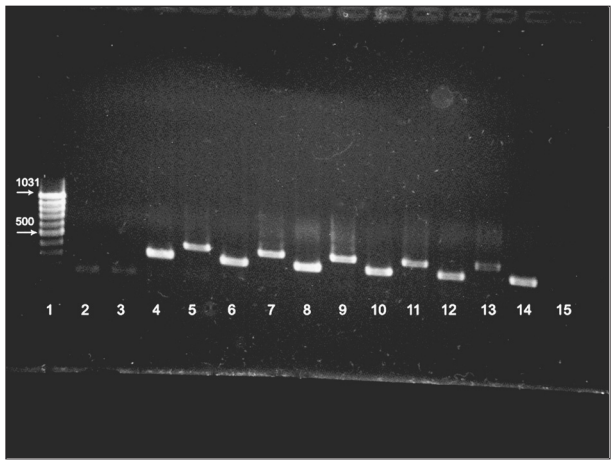


تصویر ۱- محصولات ۴۳۴bp حاصل از آزمون PCR، پس از استفاده از آغازگر شناساگر ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده (ردیف بالا)، محصولات ۳۱۴bp پس از استفاده از آغازگر شناساگر ژن آنتی ژن A(ردیف پایین)· ستون ۱: مارکر ۱۰۰bp، ستون ۲: بلانک، ستون ۳: کنترول منفی (DNA لکوسیتهای یک مرغ فاقد علائم)، ستون ۴: تومور عضله سینه، ستون ۵: واکسن دوگانه HVT-Rispens، ستون ۶، ۷ و ۸: طحال، ستون ۱۰، ۹ و ۱۱: کبد، ستون ۱۲: تخمدان، ستون ۱۳: پیش معده، ستون ۱۴ و ۱۵: بورس فابریسیوس.

انکوبه گردید. مایع رویی حاصل از ۳ دقیقه سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰RPM دور ریخته شد و با ۷۰۰µl محلول شستشو، سیلیکای رسوب کرده که رشته‌های DNA را در اتصال به خود داشت دو بار شستشو و سه دقیقه با دور ۱۰۰۰۰RPM سانتریفوژ گردید و در نهایت با ۱۵۰µl آب مقطر استریل، سیلیکای رسوب داده شده را به حالت معلق در آورده و در طی ۲۰-۱۵دقیقه انکوباسیون در ۶۵درجه سانتیگراد، DNA موجود، در آب به حالت محلول در آمد و با سه دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰RPM، سیلیکا رسوب و مایع رویی محتوی DNA به لوله تازه‌ای منتقل گردید و در دمای پایینتر از ۲۰-درجه سانتیگراد نگهداری شد.

روش استخراج DNA از نمونه‌های بافتی: نمونه‌های بافتی نیز پس از شستشوی قطعات ۵۰۰-۱۰۰mg در PBS استریل و سرد، در ۱cc بافر لیزکننده، هموژنیزه شده و یک ساعت در ۶۵درجه سانتیگراد قرار داده شد و مایع رویی حاصل از ۵ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰RPM به لوله دیگری منتقل گردید و برای زدودن RNA موجود در نمونه، از ۵µl آنزیم RNase (۱۰mg/ml) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷درجه سانتیگراد استفاده شد. پس از آن، ۰/۷ حجم از ترکیب کلروفرم-ایزوآمیل الکل با نسبت ۱ به ۲۴ به نمونه‌ها اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰RPM سانتریفوژ گردید تا فازهای مختلف از هم جدا شوند. پس از انتقال فاز آبی به لوله دیگر، یک حجم محلول I و ۸۰µl ماتریکس سیلیکا به آن اضافه گردید و بقیه مراحل مشابه جداسازی DNA از خون کامل میباشد. لازم به ذکر است که بافر لیزکننده در هر دو مورد متشکل از ۱cc بافر B، ۱۵µl بتامرکاپتواتانل و ۲۰µl آنزیم پروتئیناز K (۱۰mg/ml) بوده است. استخراج DNA از نمونه واکسن دو گانه HVT-Rispens به مانند نمونه‌های بافتی صورت پذیرفت.

روش انجام PCR: آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR دو زوج بودند.



تصویر ۲- محصولات با طولهای ۴۳۴bp و ۳۱۴bp حاصل از آزمون PCR جهت مقایسه تفاوت وزن آنها، ستون ۱: مارکر ۱۰۰bp، ستون ۲: بلانک، ستون ۳: کنترول منفی، ستون ۴ و ۵: کبد، ستون ۶ و ۷: طحال، ستون ۸ و ۹: تخمدان، ستون ۱۰ و ۱۱: پیش معده، ستون ۱۲ و ۱۳: عضله سینه، ستون ۱۴ و ۱۵: واکسن دوگانه HVT-Rispens.

یک زوج، مشخص کننده ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده (Tandem repeat) در سروتیپ یک که ردیف نوکلئوتیدی آن به صورت زیر است (۳،۷،۱۱):

آغازگر مستقیم 5' TAC TTC CTA TAT AGA TTG AGA CGT 3'

آغازگر معکوس 5' GAG ATC CTC GTA AGG TGT AAT ATA 3'

زوج دیگر، مشخص کننده ژن A سروتیپ یک می‌باشد که ردیف نوکلئوتیدی آن به قرار زیر است (۳،۷،۱۱):

آغازگر مستقیم 5' GAG GTA CCT CAT GGA CGT TCC ACA 3'

آغازگر معکوس 5' ACA TTC TTT TCG TTG GCG TGG TAT 3'

ترکیبات مختلف شرکت کننده در واکنش زنجیره ای پلی مراز بصورت ۵µl بافر ۱۰xPCR محتوی ۲mM MgCl۲، dNTP به میزان ۲۰۰ µ M از هر کدام، آغازگرها به میزان ۱µ M برای هر کدام، آنزیم Taq پلی مراز به میزان ۱/۵ واحد تنظیم گردیدند. حجم نهایی واکنش ۵۰µl بود که ۵µl از این مقدار مربوط به نمونه DNA مورد آزمایش می باشد. این واکنش در لوله‌های ۲۰۰µl و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر با برنامه‌ای به این قرار انجام شد: ۱- ۹۵درجه سانتیگراد پنج دقیقه ۲- ۳۵ سیکل شامل الف) ۹۴ درجه سانتیگراد سی و پنج ثانیه ب) ۵۵درجه سانتیگراد سی و پنج ثانیه ج) ۷۲درجه سانتیگراد سی و پنج ثانیه ۳- ۷۲درجه سانتیگراد پنج دقیقه.

محصولات PCR در ژل آگارز ۱درصد، به مدت ۱۵ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰V الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱µg/ml) در برابر تابش U.V. تصویربرداری به عمل آمد. مارکرهای مورد استفاده شامل ۱۰۰ bpDNA شرکت BIOTOOLS و ۱kb Fermentas می باشند.

نتایج

در تصویر ۱، باندهای مثبت حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز که از نمونه‌های مرضی و واکسن دو گانه HVT-Rispens به‌دست آمده است، قابل مشاهده است و در شکل ۲ تفاوت در وزن این دو باند بهتر مشهود است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- تعداد و درصد موارد مثبت و منفی از نظر ویروس عامل بیماری مارک در بافتهای مورد آزمایش

نام بافت	طحال	کبد	تخمدان	عضله سینه	کلیه	پیش معده	بورس فابریسیوس	مجموع
تعداد و درصد موارد مثبت	۷ (۱۶/۶۶درصد)	۸ (۱۹/۰۴درصد)	۱ (۲/۳۸درصد)	۱ (۲/۳۸درصد)	۰	۱ (۲/۳۸درصد)	۲ (۴/۷۶درصد)	۲۰ (۴۷/۶درصد)
تعداد و درصد موارد منفی	۷ (۱۶/۶۶درصد)	۹ (۲۱/۴۳درصد)	۴ (۹/۵۲درصد)	۰	۱ (۲/۳۸درصد)	۱ (۲/۳۸درصد)	۰	۲۲ (۵۲/۴درصد)
مجموع	۱۴ (۳۳/۳۳درصد)	۱۷ (۴۰/۴۷درصد)	۵ (۱۱/۹درصد)	۱ (۲/۳۸درصد)	۱ (۲/۳۸درصد)	۲ (۴/۷۶درصد)	۲ (۴/۷۶درصد)	۴۲ (۱۰۰درصد)

همان‌طور که در اشکال ۱ و ۲ مشخص است، آغازگر شناساگر ژن A، یک باند ۳۱۴bp را در موارد مثبت و همچنین در نمونه واکسن دو گانه Rispens-HVT تولید کرده است. این بافتهای توموری بیشتر از طیور تخمگذار و مادر بودند که اکثرا" در سن یک روزگی، واکسن مارک را دریافت کرده بودند. این بافتها شامل اعضایی نظیر کبد، طحال، پیش معده، تخمدان، بورس فابریسیوس و تومور عضله سینه بودند. از تعداد ۴۲ نمونه بافت توموری، تعداد ۲۰ بافت، باند ۳۱۴bp ۶ را نشان دادند و بافتهای باقی مانده با وجود توموری بودن و همچنین ۴۰ نمونه خون متعلق به گله‌های تخمگذار ۱۹ هفته به ظاهر سالم که واکسن مارک را هم دریافت کرده بودند، هیچ باندی نشان ندادند. آغازگرهای شناساگر ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده نیز در تمامی موارد مثبت از نظر ژن A، واجد یک باند قوی ۴۳۴bp که نشان دهنده دو کپی از ردیف ۱۳۲bp می‌باشد و یک باند سبکتر و در عین حال ضعیفتر که شاخص وجود یک نسخه از آن ردیف نوکلئوتیدی است بودند، به استثنای نمونه واکسن دو گانه HVT-Rispens که در ژل ۱ درصد، هیچ باند مشخصی نداشت.

جدول ۱، نوع و تعداد بافتهای مورد آزمایش و همچنین تعداد و درصد موارد مثبت و منفی از نظر وجود ویروس بیماریزای مارک را نشان میدهد. از کل بافتهای مورد آزمایش، ۴۷/۶ درصد آنها از نظر بیماری مارک مثبت بودند. لازم به ذکر است که تعداد ۴۲ نمونه بافت از ۴۰ پرنده جمع آوری شد یعنی در دو پرنده، دو نمونه بافت واجد علائم تومور برداشت گردید. این دو بافت شامل طحال و بورس فابریسیوس بودند.

بحث

معمولا ویروس بیماریزای مارک پس از پاساژهای متوالی، توانایی تولید آنتی ژن A را از دست می دهد(۱۰). لذا در آزمون PCR، اگر از آغازگر شناساگر ژن A استفاده شود، نتیجه منفی به‌دست خواهد آمد، در حالی که در مورد ویروس بیماریزای مارک، نتیجه مثبت خواهد بود(۷). این موضوع به‌طور عملی در لهستان توسط Kozdrun و همکاران در سال ۲۰۰۱ مورد آزمایش قرار گرفت(۷)، به‌طوری که این محققین، آغازگر مورد بحث را یک آغازگر مناسب جهت افتراق ویروسهای تخفیف حدت یافته از ویروسهای بیماریزای سروتیپ ۱ معرفی کردند، در حالی که Becker و همکاران در سال ۱۹۹۲ این آغازگر را وسیله افتراق دهنده بین ویروسهای فوق نمی دانستند، چرا که یک باند ۳۱۴bp در هر دو مورد (بیماریزا و تخفیف حدت یافته) قابل نشان دادن بود.

همان‌طور که در مقدمه ذکر گردید، آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه، برای شناسایی MDV-1 اختصاصی هستند، اما با توجه به تفاوت در میزان تخفیف حدت سویه CVI-988 (Rispens) در واکسنهای مورد مطالعه محققین مختلف و همچنین استفاده از واکسن دو گانه Rispens-HVT در ایران، از واکسن مذکور به عنوان نمونه ای جهت آزمون PCR استفاده شد تا وضعیت تخفیف حدت سویه Rispens موجود در این واکسن که از سویه‌های MDV-1 است، از نظر ژن A روشن شود و در این وضعیت مشاهده گردید که این سویه واجد ژن مذکور بوده و مشابه نتیجه ای که Becker و همکاران در سال ۱۹۹۲ گرفتند، در آزمون PCR یک باند ۳۱۴bp نظیر سویه‌های حاد ایجاد می کند. این پدیده احتمالا" به دلیل تعداد کم پاساژ ویروس واکسن در کشت سلول می باشد. با توجه به این نکته، بکار گیری از آغازگر ژن A به تنهایی قادر به تفکیک سویه واکسن سروتیپ ۱ مورد استفاده در ایران از سویه‌های بیماریزای MDV-۱ نمی باشد و تنها می تواند شناساگر سویه‌های سروتیپ ۱ ویروس بیماری مارک باشد.

در اینجا رابطه ای بین وجود ژن A و عدم تکرار ردیف ۱۳۲bp بیش از سه نسخه وجود دارد. در مطالعه ای که Kozdrun و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۷) انجام دادند باند ۳۱۴bp مربوط به ژن A را در سویه تخفیف حدت یافته سروتیپ یک (Rispens) نیافتند و در عین حال یک باند قوی که نشان دهنده تعداد حدود شش نسخه از ردیف ۱۳۲bp می باشد را گزارش نمودند و هیچ باند دیگری را در این آزمون PCR معمولی (غیر رادیواکتیو) گزارش نکردند. این نشان می دهد که ویروس Rispens مورد مطالعه آنها به تعداد زیادی پاساژ یافته، به‌طوری که با پاساژهای مکرر، تخفیف حدت زیادی یافته و آنتی ژن A را هم تولید نمی کند و در عین حال واجد تعداد زیادی از ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده شده است. اما در مطالعه ای که Becker و همکاران در سال ۱۹۹۲ (۳) انجام دادند در استفاده از آغازگر ژن A یک باند واضح ۳۱۴bp را پس از کاربرد

www.SID.ir

Archive of SID

DNA ویروس Rispens در آزمون PCR مشاهده کردند و با بکارگیری از آغازگر ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده، هیچ باند واضح قابل تشخیصی در ژل آگارز مشاهده نکردند و در آزمون PCR رادیواکتیو که محققین اخیر انجام دادند توانستند که باندهای چندگانه نشان دهنده تعداد نسخه‌های متفاوت از ردیف ۱۳۲bp را نشان دهند که البته در بین این باندها، باندی که نشان دهنده دو کپی از ردیف مورد نظر است کمی قویتر از سایرین بود(۳،۷).

در مطالعه حاضر به مانند مطالعه Becker و همکاران در سال ۱۹۹۲(۳)، پس از استفاده از آغازگرهای ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده در آزمون PCR، هیچ باند مشخصی در مورد سویه Rispens مشاهده نشد، اما در ۴۷/۶ درصد از بافتهای توموری مورد آزمایش، نظیر نتیجه مطالعه محقق فوق، یک باند قوی ۴۳۴bp مشاهده گردید که نشان دهنده وجود دو نسخه از ردیف مذکور می‌باشد و لذا طبق همین مطالعه (۳) سویه‌های بیماریزا از غیر بیماریزا تفریق داده شد.

از طرفی Cui و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که سویه (Rispens) CVI-988 حداکثر تا ۱۸ روز پس از تلقیح در خون قابل ردیابی است و پس از آن ویروس را نمی توان در پیکر پرندگان واکسینه، نشان داد(۶). در مطالعه حاضر که نمونه‌های خون ۴۰ پرنده ۱۹ هفته فاقد علائم و واکسینه شده علیه بیماری مارک، که با روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند، با هیچ یک از آغازگرهای مورد استفاده، باند مشخصی مشاهده نگردید. ضمنا" در ۲۲ پرنده واجد علامت که یکی از بافتهای توموری آنها مورد آزمایش قرار گرفت نیز نتیجه آزمون PCR حتی از نظر وجود سویه Rispens منفی بود. لذا واکسیناسیون بویژه اینکه در یک روزگی انجام می شود و همچنین طیور مبتلا، سنی بالای ۱۶ هفته داشتند، خوشبختانه مشکلی در تشخیص این بیماری ایجاد نمی کند، کما اینکه آغازگرهای شناسا گر ردیف ۱۳۲bp تکرار شونده، قابلیت این افتراق را دارند.

همان طور که در قسمت نتایج ذکر شد، ۴۷/۶ درصد از نمونه‌های بافتی از نظر وجود اسید نوکلئیک ویروس بیماریزای مارک، مثبت بودند و در سایرین نتیجه منفی بود. لذا علاوه بر ویروس بیماری مارک، عوامل دیگری نیز در ایران موجود هستند که عامل ضایعات توموری در احشاء طیور می باشند. این ضایعات، نه تنها در طیور تخمگذار و مادر، بلکه در طیور گوشتی ۵۰ روزه نیز مشاهده شد و پیشنهاد می شود که در مطالعات بعدی، با آغازگرهایی که سایر ویروسهای تومورزا را شناسایی می کنند کار شود تا این عوامل نیز شناسایی گردند.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این مطالعه در قالب طرح مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به شماره ۲۱۵/۴/۶۵۸ پرداخت شده است. بدین وسیله از زحمات معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدر دانی می‌گردد. همچنین از آقای محمد مهدی غفاری، کارشناس محترم آزمایشگاه بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در خونگیری از طیور مورد مطالعه مساعدت کردند، آقای دکتر جعفر پازانی، دستیار رشته تخصصی بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در جمع آوری نمونه‌های بافتی همکاری نمودند و آقای دکتر سید مهدی طباطبایی، کارشناس محترم بخش مبارزه با بیماریهای طیور سازمان دامپزشکی کل کشور، سپاسگزاری به عمل می آید.

References

۱.خدا کرم تفتی، ع .(۱۳۷۲): بررسی پاتولوژیک (ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک) بیماری مارک (MD) در تعدادی از مرغداریهای اطراف تهران، پایان نامه برای دریافت درجه دکتری تخصصی آسیب شناسی دامپزشکی از دانشگاه تهران، صفحه: ۱۱۵-۹۸.

۲. کیوانفر، هـ . و کریمی، ن . (۱۳۷۶): ویروس شناسی دامپزشکی (بخش بیماریها)، چاپ اول، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، صفحه: ۷۵-۷۱.

3. Becker, Y., Asher, Y., Tobar, E., Davidson, I., Malkinson, M. and 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.
4. Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M. and Yoder, H.W. (1991): Disease of poultry. In Marek's disease, 9th ed. Wolfe publishing LTD. London, UK, pp: 342-385.
5. Churchill, A.E. and Biggs, P.M. (1967): Agent of Marek's disease in tissue culture. Nature, 215: 528-530.
6. Cui, Z. and Yin, J. (2001): Differential viremia dynamics for virulent and vaccine strains of Marek's disease viruses. 6th international symposium on Marek's disease. pp: 273-278.
7. Kozdrun, W., Samorek-Salamonowicz, E. and Czekay, H. (2001): Polymerase chain reaction for the differentiation of Marek's disease virus strains. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 45: 5-10.
8. Marek, J. (1907): Multiple Nervenentzuendung (polyneuritis) bei Huehnern. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 15: 417-421.
9. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol, 155: 335-350.
10. Silva, R.F. (1992): Differntiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction

www.SID.ir

Archive of SID

amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. Avian Diseases. 36: 521-528.

11. Vathsala, M., Kumanan, K., Saravanabhava, K. and 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.
12. Zhu, G.S., Ojima, T., Hironaka, T., Ihara, T., Mizukoshi, N., Kato, A., Ueda, S. and Hirai, K. (1992): Differentiation of oncogenic and non-oncogenic strain of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. Avian Diseases. 36: 637-645.

www.SID.ir