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]

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

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

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

*نویسنده مسئول: Moshkelanii@yahoo.com

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

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 بروز 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 تکرارشونده 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 تکرارشونده تشخیص داده شد. ازآنجاکه کلیه نمونه‌های مورد آزمایش دارای علایم 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.

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

Rabiei, S.[1,3*], Moshkeleni, S.[1,2], Doosti, A.[1], Javaheri-Koupaei, M.[1,3], Majlesi, A.[1]

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

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

[3]*Young 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.

مقدمه

بیماری مارک، یک بیماری لنفوپرولیفراتیو در طیور است که با ضایعات نئوپلاستیک در ارگان های مختلف مشخص می شود و عامل ایجاد کننده آن آلفا هرپس ویروس MDV می باشد (۸). این ویروس دارای سه سروتیپ یک، دو و سه می باشد که سروتیپ شماره یک خصوصیات بیماریزایی بیشتری از خود بروز می دهد 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 می باشد، به آن لنفوماتوز عصبی نیز می گویند. این بیماری مختص ماکیان است ولی گاهی در بلدرچین و بوقلمون ها نیز دیده می شود (۴).

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

علائم ماکروسکوپیک بیماری شامل تورم فولیکول های پر، مشاهده نقاط خونریزی در ساق پا، تومور عضلات مخطط و بزرگ شدن امحاء و احشاء و ... می باشد. در اثر آلودگی گله های طیور به سروتیپ شماره ی یک این ویروس، گله ها متحمل تلفات قابل توجهی می شوند (۶).

جهت پیشگیری از این بیماری می توان از واکسن های زنده یا تخفیف حدت یافته مشتق شده از سروتیپ های 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 می شود (۷).

البته این روش ها برای تشخیص دقیق و قطعی این بیماری و همچنین تشخیص سویه ها از همدیگر به اندازه کافی حساس و اختصاصی نیستند. بنابراین برای تشخیص دقیق بیماری و همچنین تعیین هویت سویه ها می توان از روش های مولکولی استفاده کرد (۱۰ و ۵).

هدف از انجام این تحقیق تنظیم روش PCR به عنوان روشی 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 می باشد.

مواد و روش کار

جهت انجام این مطالعه تعداد ۲۸۰ نمونه بافت تومور پوستی از طیور گوشتی مشکوک و دارای علائم بالینی از کشتارگاه های طیور سطح استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری شد. واکسن دوگانه HVT-Rispens نیز برای مقایسه با نمونه ها و همچنین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به منظور استخراج DNA برای تنظیم واکنش PCR، از کیت استخراج DNA ساخت 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):

'۵-F: TACTTCCTATATAGATTGAGACGT-3

'۵-R: GAGATCCTCGTAAGGTGTAATATA-3

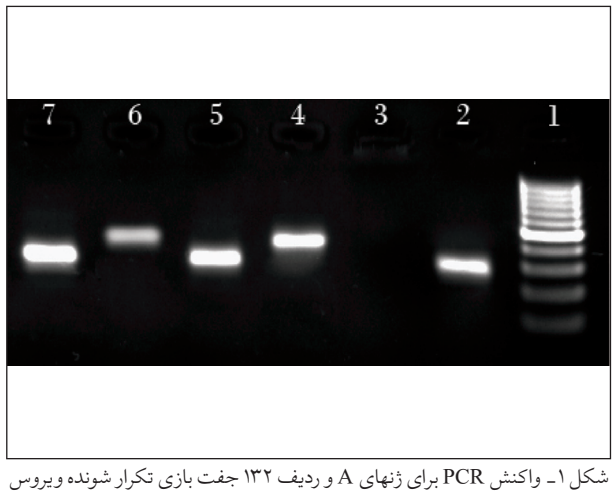
و زوج دیگر مشخص کننده ژن A سروتیپ یک می باشد که توالی نوکلئوتیدی آن عبارت است از (۹):

'۵-F: GAGGTACCTCATGGACGTTCCACA-3

'۵-R: ACATTCTTTTCGTTGGCGTGGTAT-3

واکنشگرهای مربوط به PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با هم مخلوط گردیدند. این مخلوط شامل ۲/۵ میکرولیتر از DNA ی الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول Mix dNTP، 5/1 میکرومول MgCl و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase که همگی از شرکت سیناژن ایران تهیه شده اند، می باشد. 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 می باشد 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 سانتی گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه



شکل ۱ـ 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 سانتی‌گراد 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 ۱/۵ 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 زنجیره‌ای پلیمراز طبق شرایط ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها و الکتروفورز نمونه‌ها نتایج مورد نظر بدست آمد.

از ۲۸۰ نمونه بافت تومور پوستی مورد مطالعه ۱۷۶ عدد دارای باندی به اندازه ۳۱۴ جفت باز بودند که نشان دهنده حضور ژن A در این نمونه‌ها می‌باشد. از طرفی همانطور که در شکل ۱ مشخص شده است نتایج PCR برروی واکسن دوگانه Rispens-HVT نیز وجود این باند را به دلیل وجود سروتیپ‌های تخفیف حدت یافته، تایید می‌کند. 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 قطعه ۴۳۴ جفت بازی می‌باشد. 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 می‌باشد. شماره ۲ کنترل مثبت بوده که مربوط به تکثیر ژن A در سویه واکسن HVT-Rispens است. شماره ۳ کنترل منفی، بدون DNA می‌باشد. 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 می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری مارک یکی از عوامل ایجاد کننده ضایعات توموری در طیور می‌باشد. 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 آنرا نگاه دارند.

یک نوع از آغازگرهای معمول جهت تشخیص بیماری مارک که مورد استفاده قرار می‌گیرد، شناساگر ژن A می‌باشد. آنتی ژن A یک آنتی ژن ترشحی بوده که در مایع روی کشت سلول عفونت یافته به این ویروس قابل مشاهده می‌باشد. اندازه باند حاصل از عملکرد این آغازگرها، ۳۱۴ جفت باز می‌باشد. آغازگر استفاده شده دیگر، آغازگر شناساگر ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرار شونده می‌باشد. بدان دلیل به آن ردیف تکرار شونده می‌گویند که در سویه‌های مختلف سروتیپ ۱ به تعداد مختلفی تکرار می‌شود. 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 می‌دهد، 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

PCR، نسبت به حضور این ژن مثبت باشد، بیماریزاست. در صورتی که Beckerو همکاران در سال ۱۹۹۲ در پی تحقیقات عملی نشان دادند که در کلیه سویه‌های بیماریزا و غیر بیماریزای هرپس ویروس عامل بیماری مارک، ژن A وجود دارد (۳و۱).

در تحقیق حاضر از واکسن دوگانه HVT-Rispens که یک سویه تضعیف شده می‌باشد، به عنوان کنترل مثبت بهره گرفته شد و نتایج نشان داد که در واکنش PCR، قطعه ۳۱۴ جفت بازی مربوط به ژن A تکثیر می‌گردد که با نتایج تحقیق Becker و همکاران مطابقت دارد.

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

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

موفقیت برنامه‌های 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 می‌کنند، تشخیص داده و کنترل نمود. هر چند روش‌های گوناگونی برای تشخیص ویروس مارک در طیور ابداع گردیده اما بکارگیری بسیاری از این تکنیک‌ها مستلزم صرف وقت و هزینه‌های گزافی می‌باشد. در این تحقیق سعی شده تا با تشخیص سریع این عامل بیماریزا در طیور توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز، نسبت به کنترل و پیشگیری از این بیماری اقدامات موثرتری انجام پذیرد.

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

تشکر و قدردانی

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

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

analogue with an alternative life style. *Virus Genes*, **21**: 51-64.

6. Parcells, 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) Differntiation 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 MDVgenome. *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 ononcogenic 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.