تشخیص مولکولی رئو ویروسهای طیور با روشهایNested/RT-PCR در نمونه های بافتی حاصل از گله های مشکوک به بیماری در برخی استانهای کشور

دکترناصر هرزندی[۱] *،دکترهادی کیوانفر[۲]،دکترعبدالحمید شوشتری پورمحمره [۳]،دکتر سیدعلی پوربخش[۳]

چکیده

رئو ویروسها در سالیان اخیر بعنوان عامل طیف وسیعی از عفونتها و بیماریها در ماکیان باعث خسارات شدید اقتصادی در صنعت پرورش طیور بوده اند. با توجه به شیوع و گسترش عفونتهای رئو ویروسی و وجود یافته های بالینی و سرولوژی، حضور آلودگی به این ویروسها در مزارع پرورش طیور کشورمان قطعی به نظر می رسد. نظر به حساسیت، سرعت و دقت بالای روشهای مولکولی در تشخیص عوامل عفونی مختلف هدف این تحقیق راه اندازی و بهینه سازی آزمایشات RT-PCR و Nested PCR جهت تشخیص رئو ویروسها در نمونه های مشکوک بود. به این منظور با استفاده از واکسن زنده (سویه 1133) به عنوان کنترل مثبت و پرایمرهای اختصاصی قطعه S1 ژنوم ویروس تست مذکور راه اندازی گردید و محصولات PCR نمونه های بالینی از نظر تکثیر قطعات ۷۳۸ و ۳٤۲ جفت بازی بررسی شدند. در راستای تشخیص حضور ویروس در نمونه های بالینی، علاوه بر بررسی مستقیم نمونه های اولیه ، به منظور فراهم نمودن امکان تکثیر ویروس احتمالی موجود در آنها، نمونه ها در دو مسیر مختلف از یک سو به داخل کیسه زرده تخم مرغ جنین دار ٦ روزه تزریق و از سوی دیگر در محیط کشت سلولهای کبد جنین جوجه (CEL) تلقیح شدند، مایعات و بافتهای جنینی و مایعات کشت نیز پس از برداشت، مجدداً مورد آزمایشات مولکولی قرار گرفتند.

در این بررسی ۱۳ نمونه از مقاطع بافتی مختلف از قبیل تاندون، بافتهای مفصلی، لوزه های سکومی، طحال و کلیه مورد بررسی قرار گرفتند که از این میان ۲ نمونه به روش مولکولی مثبت تشخیص داده شد علاوه براین عوارض و علائم مورد انتظار در پی تزریق به کیسه زرده تخم مرغ (خونریزی شدید و گسترده زیر جلدی و کاهش رشد جنین) و نیز ضایعات سلولی یا CPE (تشکیل سن سیتیوم، دژنرسانس سلولی و گنجیدگی های داخل سیتوپلاسمی) در اثر تلقیح نمونه های مثبت به محیط کشت کبد جنین جوجه مشاهده و ثبت گردیدند. یافته های این تحقیق علاوه بر اثبات وجود رئو ویروسها درمزارع پرورش طیور ایران نشان داد که روشهای مولکولی می توانند بعنوان روشهای بسیار حساس همانند روش کشت و حتی سریعتر از آن آلودگی به رئو ویروسها را در نمونه های مشکوک نشان دهند.

واژگان کلیدی: *رئو ویروس طیور، آر تی- پی سی آر، نستد پی سی آر*

Molecular detection of avian reoviruses using RT and Nested PCR in tissue samples of suspicious flocks in some provinces of Iran

Harzandi.N[1], Keyvanfar.H[2], Shoushtari.A.H[3], Pourbakhsh.S.A[3]

1-Graduated of Microbiology, Faculty of Specialised Veterinary Sciences,Islamic Azad University ,Science& Research Campus,Tehran-Iran.

2-Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

3-Department of the Poultry Diseases,Razi vaccine and serum research institute, Kardj-Iran

Avian reoviruses have been widely involved in infections conditions of Poultry industry and resulted serious economic losses. According to wide prevalence of reoviral infections and clinical or serological findings,the existance of these infections in Iranian poultry farms seems to be definite. Because of high sensitivity, rapidity and accuracy of molecular methods in the detection of microbial (infectious)agents, the aim of this study was to optimize the RT-PCR and Nested PCR methods for diagnosis the avian reoviruses in suspi specimens. For this purpose we used live - vaccine S1133 as positive control and specific primers for S1-segment of avian reoviruses. PCR products of clinical samples were examined for amplification of 738, 342 bp segments.The samples inoculated to specific pathogen free (SPF) embryocated eggs via yolk sac route and chicken embryo liver cell cultures, fetus and amnioallantoic fluids from inoculated eggs and culture fluids were collected and then tested for propagation of virus. The samples of this study were tissue specimens including tendon, hock joint, secal tonsils,spleen, kidney obtained from Chicken flocks and only two samples were. The positive effects of virus inoculation to yolk sac of eggs (massive subcutaneous hemorrhage and dwarfed embryos)and to chicken embryo liver cells (syncytia formation, cell degeneration and intracytoplasmic inclusion bodies) were observed after inoculation of ositive samples. The findings of this study not only confirmed the presence of avian reoviruses in chicken flocks of Iran but also revealed that the molecular methods are more sensitive and even more rapid method for detection of avian reoviruses.

Key words*: Avian reovirus, RT-PCR, Nested PCR*

۱- دانش آموخته دکتری تخصصی میکروبیولوژی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی ،تهران- ایران

۲-گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران -ایران

۳-بخش بیماریهای طیور ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج،کرج-ایران

مقدمه

به موازات رشد روزافزون وتوسعه فراگیر صنعت پرورش طیور در مناطق مختلف جهان در دهه های اخیر بیماریهای درگیر کننده گله های پرورش نیز به جهت وارد ساختن تلفات و ضایعات اقتصادی به واحد های صنعتی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته اند. عفونتهای رئو ویروسی از سالها قبل به عنوان عامل ضایعات ودرگیری های متعدد در نژادهای مختلف طیور شناخته شده و مطرح بوده اند ولی به سبب تحولات چشمگیر بویژه درعرصه پرورش مرغان مادر و گوشتی و کاهش ضریب تبدیل تولیدات و طول دورهٔ پرورش، نقش این عفونتها در عقب ماندگی رشد جوجه ها و پائین آمدن راندمان تولید و نتیجاً وارد آمدن خسارات هنگفت اقتصادی به گله ها بیش از گذشته روشن گردیده است. علاوه بر ضایعات مفصلی (آرتریت وتنوسینوویت)، سندرم سوء جذب و کاهش رشد به طور مشخص ودرگیری اندامهای مختلف ازقبیل قلب، پیش معده ، بورس و ضایعات تنفسی در طیور مبتلا از عوارض معمول عفونتهای رئو ویروسی می باشد (۵،۶) همچنین بر اساس نتایج تحقیقات بعمل آمده رئوویروسها نیز در زمره عوامل سرکوب کننده سیستم ایمنی در ماکیان قلمداد می شدند (۶).

نکته شایان ذکر دیگر اینکه به دلیل ویروسی بودن ومهمتر از آن تحت بالینی بودن عفونت در بسیاری از اوقات امرواکسیناسیون دراین رابطه بسیار مهم و ضروری به نظر می رسد. با توجه به شیوع و گستردگی عفونتهای رئو ویروسی در گوشه و کنار جهان ونیز وجود شواهد بالینی ویافته های سرولوژی مختلف در ایران، حضور آلودگی به رئو ویروسها در مزارع پروش طیور کشورمان قطعی به نظر میرسد. از سوی دیگر نبود پیشینه تحقیقاتی کافی و مستند در این رابطه بویژه در زمینه مطالعات مولکولی لزوم انجام بررسیهای مختلف پیرامون سویه های دخیل در درگیری واحدهای صنعتی درکشور را مطرح می سازد. نظر به اهمیت، حساسیت و سرعت نسبتاً بالای روشهای مولوکولی و جایگاه ویژه آنها درتشخیص عوامل عفونی مختلف، هدف این طرح،راه اندازی وبهینه سازی (set up) آزمایشاتRT-PCR و Nested PCR جهت شناسایی و تشخیص حضور رئوویروسها در نمونه های مشکوک بود. با راه اندازی این تست علاوه بر تشخیص آلودگی واحدهای پرورش به عوامل ویروسی مذکور، زمینه و امکان بررسی های مولکولی دیگر از قبیل تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های محدود کننده و نهایتا شناسایی و تفکیک سویه های دخیل در عفونتهای رئو ویروسی طیور در کشورمان فراهم می گردد که این امر مقایسه ویژگیهای سویه های داخلی و سویه های مورد استفاده در تهیه واکسنهای تجارتی را مقدور خواهد ساخت.

مواد و روش کار

الف) نمونه ها: تعداد ۱۳نمونه مورد بررسی در این طرح عبارت بودند از مقاطع منجمد مربوط به بافتهای مفصلی و تاندون(ناحیه پا)، لوزه های سکومی(Cecal tonsils)، طحال و کلیه حاصل از مرغان مشکوک به آلودگی رئو ویروسی با علائم بالینی مختلف بویژه تورم والتهاب مفصلی وعقب افتادگی رشد (وازدگی)که در فاصله زمانی سالهای ۸۰ تا اوایل ۸۴ به بخش بیماریهای طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ارسال شده بودند.

کنترل مثبت : کنترل مثبت مورد استفاده در مراحل مختلف این طرح واکسن زنده (لیوفیلیزه) سویه ۱۱۳۳ رئوویروسهای طیور با نام تجاری : Nobilis reo 1133 عرضه شده توسط شرکت Intervet کشور هلند بوده است.

ب) آماده سازی نمونه ها : نمونه های مورد نظر با استفاده از محیط نگهدارنده (Triptose phosphate brath)

TPB صلایه شده و مایع رویی (سوپرننت) حاصل از سانتریفیوژ آنها برداشت می شد و پس از افزودن آنتی بیوتیک آماده مراحل بعدی می شدند، نمونه های انتخاب شده پس از آماده سازی علاوه بر اینکه مستقیماً مورد آزمایشات RT-PCR و Nested PCR قرار گرفتند به منظور فراهم شدن امکان تکثیر و تزاید ویروس احتمالی موجود در آنها در دو مسیر مختلف از یک سو به داخل کیسه زرده تخم مرغهای جنین دار ۶ روزه تزریق می شدند و از سوی دیگر درمحیط کشت سلولهای کبد جنین جوجه CEL تلقیح می گردیدند.

ج) تزریق به کیسه زرده تخم مرغهای جنین دار: از صلایه (هموژن) هر نمونه۳ تزریق به حجم ۰/۲ میلی لیتر به داخل کیسه زرده جنینهای۶ روزه حاصل از گله های SPF صورت می گرفت تلفات روزانه و تخم مرغهای باقیمانده در پایان روز هفتم به یخچال منتقل گردیده، پرده، مایعات آمینو آلانتوئیک و نیز جنینهای مربوط به طور جداگانه برداشت شده و پس از تهیه هموژن از آنها ،در دمای -70^{0c} نگهداری می شدند (تا هنگام انجام آزمایشات مولکولی).

د) تلقیح نمونه ها به کشت سلولهای کبد جنین مرغ (CEL): محیط کشت مذکور به روش معمول (۷) وبا استفاده از جنینهای ۱۶-۱۴ روزه مرغ تهیه می گردید وپس از پوشیده شدن سطح فلاسکهای حاوی محیط از سلولهای کبدی از هرنمونه (هموژن بافتی) به میزان۰/۲میلی لیتر به داخل محیط های کشت تلقیح می شد. محیطهای تلقیح شده روزانه یکبار بررسی میکروسکوپی شده و با مشاهده ضایعات سلولی(CPE (Cytophatic effect در ۸۰-۷۰٪ سطح سلولها، پس از سه مرحله انجماد و ذوب مایعات کشت جمع آوری می شدند درغیاب ضایعات سلولی مشخص نیز پس از ۷ روز محیط ها به روش فوق جمع آوری می گردیدند(۷) مایعات جنینی و نیز محیط های کشت پس از برداشت به منظور بررسی آلودگی احتمالی به سایر عوامل ویروسی مورد آزمایش (Hemagglutination HA (inhibition قرار می گرفتند. در هر نوبت درکنار تزریق نمونه های مشکوک با فتی به تخم مرغهای جنین دار و نیز تلقیح به محیط های کشت کبدی واکسن رئو ویروس (کنترل مثبت) نیز بارقت $\frac{1}{50}$ مورد استفاده قرار می گرفت .

ه) استخراج RNA: از میان روشهای مختلف موجود استخراج RNA با استفاده از کیت ویژه با نام : High pure viral nucleic acid kit عرضه شده توسط شرکت Roche صورت میگرفت . نمونه های صلایه شده اولیه، هموژنهای حاصل از پرده، مایعات و جنینهای برداشت شده از تخم مرغهای تزریق شده و نیز مایعات کشت سلولی تلقیح شده پس از جمع آوری همگی به عنوان نمونه جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار می گرفتند مراحل استخراج طبق دستور العمل ارائه شده همراه کیت مذکور انجام می شد.

و) آزمایشات مولکولی : پس از بررسی های مختلف و ارزیابی حالات گوناگون از نظر میزان و ترکیب مواد و دمای مراحل مختلف قسمتهای سه گانه آزمایشات مولکولی راه اندازی و به شرح زیر انجام گرفت:

و-۱) پرایمرها : دراین طرح از پرایمرهای اختصاصی قطعه S_1 ژنوم ویروس باتوالی زیر استفاده گردید(۳)

پرایمرهای RT-PCR:

$-S_1C$(Forward):5

ATTGAATTCTCTGTTATCTCAACCTTG-3

$-S_1D$(Reverse):5

AAGGAATTCGTTGAGAACAGAAGTAGG-3

پرایمرهای Nested PCR :

$-S_1E$(Forward):5

TCTGAATTCATCGCAGCGAAGAGAGGTCG-3

-S_1F(Reverse):5
AGTGAATTCAGTATCGCCGCGTGCGCAG
-3

و-۲) رونوشت برداری معکوس (Reverse transcription):

آزمایش فوق با استفاده از میکرویتوب های دیواره نازک به حجم ۰/۵ میلی لیتر و عاری از DNase, RNase و در حجم نهایی $۲۰\mu l$ به این صورت انجام گردید: $۵\mu l$ از RNA استخراجی هر نمونه با ۲۰ پیکومول از پرایمر S_1C و $۵/۵\mu l$ آب عاری از نوکلئاز (DDW) مخلوط گردید، مجموعه فوق به مدت ۳ دقیقه دردمای ^0C ۹۵ حرارت دیده بلافاصله در کناریخ خنک شده و سپس $^{\mu l}$ ۴ بافر RT (×5)، $^{\mu l}$ ۲ محلول dNTPs(۱۰ میکرو مولار)، $^{\mu l}$ ۰/۵ (۲۰ واحد) RNase Inhibitor (Fermentas) و نهایتا $^{\mu l}$ ۱ آنزیم رو نوشت برداری معکوس (MuLVRT) به آن افزوده شده و برنامه حرارتی ^0C ۳۷ به مدت ۵ دقیقه و ^0C ۴۲ به مدت ۶۰ دقیقه اعمال و نهایتاً آنزیم با قرارگرفتن در دمای ^0C ۹۵ به مدت ۳ دقیقه غیر فعال شد.

و-۳) واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) :

این واکنش نیز در لوله های دیواره نازک ^{ml} ۰/۵ و در حجم نهایی $^{\mu l}$ ۵۰ انجام گردید . $^{\mu l}$ ۳۴/۳ DDW ، $^{\mu l}$ ۵ با فر PCR (×10) ، $^{\mu l}$ ۱/۵ $MgCl_2$ (۵۰میکرو مولار)، ۱۵ پیکومول از هر یک از پرایمرهای S_1C و S_1D و $^{\mu l}$ ۱ محلول dNTPs (۱۰میکرومولار) مخلوط شده و سپس $^{\mu l}$ ۰/۲(۱ واحد) آنزیم polymerase (Cinna Gen) Taq DNA اضافه گردید به مجموعه فوق مقدار $^{\mu l}$ ۵ cDNA (محصول واکنش RT) افزوده وبرنامه حرارتی با دناتوراسیون اولیه (^{0c} ۹۴به مدت ۳ دقیقه) تکثیرنهایی (^{0c} ۷۲به مدت۱۰ دقیقه) و۳۵ چرخه شامل ^{0c} ۹۴ به مدت۶۰ ثانیه ،^{0c} ۶۰به مدت ۴۵ ثانیه و ^{0c} ۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Biotech اعمال شد.

و-۴) واکنش زنجیره ای پلیمراز آشیانه ای (Nested PCR) :

محصولات واکنش PCR به نسبت۱به۱۰رقیق شده (رقیق سازی درمورد نمونه های منفی صورت نمی پذیرفت) و به میزان $^{\mu l}$ ۲به مخلوط DDW۳۶ $^{\mu l}$، ۵ $^{\mu l}$ بافرPCR (×10)، $MgCl_2$۱/۵ $^{\mu l}$ ، dNTPs۱ $^{\mu l}$، ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای S_1F, S_1Eو ۰/۵ $^{\mu l}$(۲/۵واحد) آنزیم Taq DNA polymerase اضافه گردیده وبرنامه حرارتی با دناتوراسیون اولیه^{0c} ۹۵به مدت ۳دقیقه و تکثیرنهایی ^{0c} ۷۲ به مدت۱۰دقیقه و۳۰چرخه شامل ^{0c}۹۵ به مدت ۶۰ثانیه، ^{0c} ۶۲ به مدت ۴۵ثانیه و ^{0c} ۷۲به مدت ۴۵ثانیه اعمال شد.

و-۵) الکتروفورز(Electrophoresis)

جهت بررسی تکثیر احتمالی قطعه هدف در واکنشهای مذکور (۳۴۲و۷۳۸جفت بازی) ۷/۵ $^{\mu l}$ از محصولات PCR با ۱/۵ $^{\mu l}$بافر ویژه (Loading buffer) مخلوط گردیده ودر کنار یک مارکرمناسب از نظر وزن مولکولی (۱۰۰bp)در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند(با استفاده از(– Tris- Borate TBE (EDTA به عنوان حلال آگارز و نیز بافر الکتروفورز) . بعد از گذشت مدت زمان لازم جهت به حرکت در آمدن محصولات PCR (۳۰الی ۴۵ دقیقه) ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید (۵ $\mu g/ml$) رنگ آمیزی شده و پس از شستشو با دستگاه ترانس لومیناتور زیر نورماورا بنفش بررسی و نتایج مشاهده و ثبت گردید.

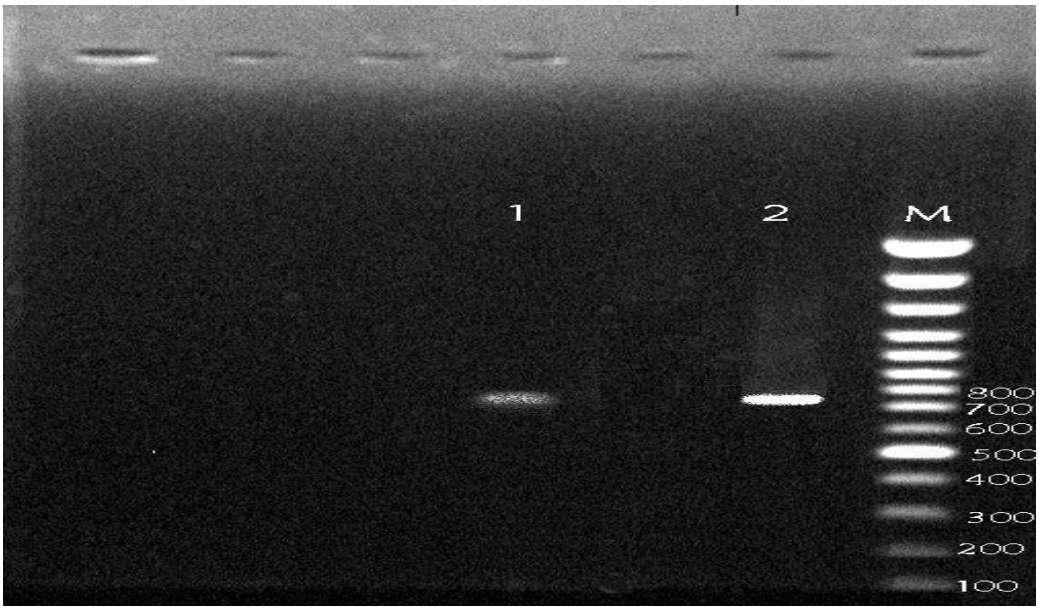
نتایج

از ۱۳ نمونه مورد بررسی در این طرح ۲نمونه مثبت تشخیص داده شدند که مشخصات مربوط به آنها در جدول شماره ۱ درج گردیده است. در رابطه با نمونه اول درالکتروفورز محصول RT-PCR نمونه اولیه باند مورد

انتظار حاصل ازتکثیر قطعه ۷۳۸جفت بازی مشاهده نگردید. درحالیکه PCR بر روی هموژن پرده و مایعات آلانتوئیک حاصل از تخم مرغهای تلف شده درپی تزریق نمونه مذکور مثبت وهمراه با تشکیل باند مربوطه دیده شد (نگاره ۱). نکته دیگر اینکه نتیجه آزمایش Nested PCR مورد این نمونه منفی گردید. در مورد نمونه دوم علیرغم منفی بودن نتیجه آزمایش RT-PCR ، انجام تست Nested PCR بر روی محصول آزمایش اول مثبت و همراه با تشکیل باند ۳۴۲ جفت بازی بود (تصویر۲). علاوه براین عوارض و علائم مورد انتظار در پی تزریق به کیسه زرده تخم مرغ (خونریزی شدید و گسترده زیر جلدی و کاهش رشد جنین) و نیز ضایعات سلولی یا CPE (تشکیل سن سیتیوم دژنرسانس سلولی و گنجیدگی های داخل سیتوپلاسمی) در اثر تلقیح نمونه های مثبت به محیط کشت کبد جنین جوجه مشاهده و ثبت گردیدند.

جدول۱: تتایج حاصل از آزمایشات مولکولي

ردیف	نوع نمونه	نوع گله	نژاد	سن گله	علامت بالینی	روش تشخیص
۱	مایع مفصلی	مادر گوشتی	ارین	۱۴هفته	التهاب مفصل	RT-PCR
۲	بافت کلیه	گوشتی	راس	۲۷روز	وازدگی	Nested PCR



نگاره۱ : الکتروفورز محصولات RT-PCR ، بررسی تکثیر قطعات ۷۳۸ جفت بازی ۱: نمونه مثبت ، ۲ : کنترل مثبت ، M : مارکر ۱۰۰ جفت بازي

بحث

گستردگی حضور و دخالت رئوویروسها در طیف وسیعی از بیماریهای طیور، اهمیت این عوامل عفونی را به سبب ایجاد ضایعات، تلفات و بویژه خسارات اقتصادی در صنعت پرورش طیور بیش از پیش مورد توجه قرار داده است، در راستای تشخیص رئوویروسها، کشت و جداسازی ویروس و روشهای سرولوژیکی و هسیتوپاتولوژی از جمله شیوه های معمول می باشند(۳).

در سالیان اخیر و در پی ابداع روشهای نوین مولکولی و رواج آنها در تشخیص عوامل عفونی مختلف و با توجه به سرعت، دقت و حسّاسیت بالای آنها بویژه در مقایسه با روشهای سرولوژی (۳) این روشها در تشخیص رئوویروسها نیز توسعه و کاربرد روز افزون یافته اند. با توجه به موقعیت پروتئین ساختمانی δc بعنوان جزئی از لایه خارجی کپسید در این ویروسها و حضور اپی توپهای ویژه سروتیپ در آن، مطالعات و بررسیهای ملکولی در دهه اخیر عمدتاً بر روی این جزء پروتئینی و ژن کد کنندهٔ آن (قطعه S_1 ژنوم ویروس) صورت گرفته است (۱،۲،۳،۴) و نتایج حاصل در تشخیص رئوویروسها و طبقه بندی سویه های مختلف آنها مورد استفاده واقع شده است. آنچه از نتایج مجموعه تحقیقات سالیان اخیر بر می آید، تغییر پذیری فراوان در توالی نوکلئوتیدی قطعات ژنوم ویروس وبه خصوص قطعه S_1 می باشد(۳،۴) که این مسئله باعث تنوع فراوان در پروتئین δc ویروس و نتیجتا اپی توپهای ویژه سروتیپ گردیده است که این تنوع سروتیپی انتخاب سویه های مناسب جهت واکسیناسیون گله ها علیه بیماریهای حاصل از رئوویروسها را با مشکل مواجه می کند (۴،۸)، اگر چه برخی معتقدند در جاتی از ایمنی متقاطع بین سویه های مختلف شناخته شده با سویه های کلاسیک آمریکایی مورد استفاده در ساخت واکسنهای تجارتی دیده می شود (۴). مشکل دیگر ناشی از تغییر پذیری بالای قطعه S_1 ژنوم ویروس، طراحی پرایمر مناسب جهت شناسایی و تکثیر قطعه مذکور در سویه های مختلف می باشد به عبارت دیگر یافتن نواحی محافظت شده در طراحی پرایمرهای اختصاصی قطعه مذکور که قادر به شناسایی همه سویه های رئوویروسهای طیور باشد بسیار دشوار بوده و همواره هدف محققین در بررسی و مقایسه جدایه های گوناگون حاصل از مواد آلوده کننده در نواحی جغرافیایی مختلف بوده است (۳).

در بررسی حاضر از ۱۳ نمونه بافتی مشکوک به آلودگی رئوویروسی که مورد آزمایشات تشخیص مولکولی قرار گرفتند ۲ نمونه مثبت تشخیص داده شدند. یک نمونه به روش RT-PCR و دیگری Nested PCR ، در مورد نمونه اول مثبت شدن PCR هموژن پرده و مایعات آلانتوئیک تخم مرغ های تلف شده در پی تزریق نمونه (علیرغم نتیجه منفی آزمایش مستقیم نمونه اولیه) دلالت بر تکثیر یافتن میزان اندک ویروس در مایع مفصلی مورد بررسی داشته است. نکته دیگر در رابطه با نمونه مثبت نخست، عدم تشکیل باند ۳۴۲ جفت بازی در آزمایش Nested PCR بود که این امر را می توان به تغییرات رخ داده در ناحیه اتصال پرایمرهای مربوطه نسبت داد، که با توجه به تغییر پذیری بالای ژنتیکی رایج در قطعات ژنوم ویروس اتفاقی بسیار محتمل است. در مورد نمونه دوم، نتیجه منفی آزمایش RT-PCR و مثبت بودن نتیجه در روش Nested PCR به احتمال بسیار به میزان اندک ویروس در نمونه مذکور و حساسیت بیشتر روش Nested PCR در مقایسه با روش اول مرتبط است. در نتایج از تحقیق لیو و همکاران (۱۹۹۹) حساسیت روش Nested PCR ، 10^3 تا 10^4 برابر روش RT-PCR اعلام گردید (۱) که همانطورکه ذکر شد این مسئله می تواند توجیهی بر مغایرت نتایج حاصل از دو روش مولکولی مورد استفاده در تحقیق حاضر باشد.علیرغم نتایج حاصل از این تحقیق در تشخیص مولکولی رئو ویروسهای طیور در نمونه هاي مشکوک براي نخستین بار

در کشور، با توجه به گستردگي حضور و دخالت اين ويروسها در طيف وسيعی از عفونتها و بيماريهای ماکيان از يک سو و تغيير پذيري فراوان قطعات ژنوم ويروس از سوي ديگر انجام مطالعات و بررسيهای مولکولي بيشتر در راستای تشخيص ويژگيهای سويه هاي داخلی ضروري به نظر مي رسد.

تشکر و سپاسگزاری

بدينوسيله از همکاری صميمانه پرسنل محترم بخش بيماريهای طيور موسسه رازی کرج تقديروتشکر مي گردد.

فهرست منابع

1.Liu, H.J., Chen, J.H., Liao, M.H., Lin, M.Y., Chang, L.G.N. (1999): Identification of the Sigma C-encoded gene of avian reovirus by nested PCR and restriction endonuclease analysis.Journal of Virological Methods 81;83-90.

2.Liu, H.J., Giambrone, J.J., (1997): Amplification, cloning and sequencing of the Sigma C-encoded gene of avian reovirus. Journal of Virological Methods 63;203-208.

3.Liu, H.J., Giambrone, J.J., Nielsen, B.L. (1997): Molecular characterization of avian reoviruses using nested PCR and nucleotide sequence nalysis.Journal of Virological Methods 65;159-167.

4.Liu, J.H., Lee, H.L., Shih, W.L., Li, Y.J., andSu, H.Y. (2004): Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism.Avian Pathology, 33(2), 171-180.

5.Mcnulty, M.S., Jones, R.C., Cough, R. (2002): Reoviridae in poultry diseases (5th ed.): 338-342

6.Rosenberger.J.K, Jones, R.C. (2003): Viral arthritis in the diseases of poultry(11th ed.):283-298

7.Schat, K.A., Pourchase,G. (1998): Cell culture methods. Isolation and Identification of avian pathoegens, 4th Edition:223-234.

8.Van der Heide, L., (2000): The History of Avian Reovirus,Avian Diseases 44:638-641