بیماری مارک در مرغهای گوشتی استانهای خراسان، اصفهان و تهران

دکترمجید فرهودی[۱] *، دکتررضا طرقی[۲]، دکتر محسن ملکی[۳]، دکترمحمد رضا باسامی[۳]، دکتر مهدی کیانی زاده[۲]، دکتر سعید چرخکار[٤]

چکیده

بیماری مارک یک بیماری ویروسی لنفوپرولیفراتیو جوجه ها با اهمیت اقتصادی بوده که توسط یک آلفا هرپس ویروس ایجاد می شود. ویروس های بیماری مارک موجب تضعیف سیستم ایمنی شده و باعث آسیب پذیری بیشترماکیان دربرابرعوامل بیماریزای دیگر می گردد.این بیماری بیشتر، مشکل گله های مادر و تخمگذار می باشد و در طیور گوشتی کمتر مطرح می باشد. در این تحقیق ۲۲ گله مرغ گوشتی از کشتارگاههای صنعتی خراسان، اصفهان و تهران جهت مطالعات آسیب شناسی از بافتهای مختلف و ردیابی سروتیپ یک ویروس مارک از طحال به روش PCR تحت بررسی قرار گرفتند. در شش گله (۲۷ درصد) جراحات ماکروسکوپیک شامل نودولهای توموری در قاعده فولیکول پرها وعلائم میکروسکوپیک شامل نفوذ سلولهای پلی مورفیک لنفوبلاستیک در ناحیه درم پوست مشاهده گردید. همچنین واکنش PCR نیز در این گله ها مثبت بودند ،در هشت گله دیگر با اینکه فاقد علائم ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک بودند ولی در آزمایش PCR مثبت ارزیابی شدند. در هشت گله باقیمانده تمامی علائم ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک و واکنشPCR نیز منفی بودند. با توجه به وجود ۲۷ درصدی بیماری مارک در میان گله های مرغ گوشتی بررسی شده و همچنین طبیعت ایمنوساپرسیو بودن این ویروس، به نظر میرسد این ویروس نقش عمده ای را در سندرم تضعیف سیستم ایمنی ماکیان ایران به عهده دارد. توصیه میشود به منظور کاهش خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری اقدامات پیشگیرانه موثری اتخاذ شود.

واژگان کلیدی: *بیماری مارک، مرغ گوشتی، PCR، ایران*

Marek disease in broiler's chicken flocks of khorasan, Esfahan and Tehran provinces

Farhoodi, M.[1]*, Toroghi, R.[2] , Bassami, M.R.[3] ,Kianizadeh, M.[2] , Charkhkar, S.[4]

1-Postgraduated of Faculty of specialized veterinary sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran,Iran
2-Department of Veterinary Research and Biotechnology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Iran,
3-School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University, Mashhad,Iran
4-Department of Poultry Disease, Faculty of specialized veterinary sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran,Iran

Marek disease (MD), is an economically important lymphoproliferative disease of primarily chickens, is caused by an alphaherpesvirus. MD viruses cause immunosuppression and predispose poultry to other infectious diseases. The disease is considered to be an important disease in layer and breeder flocks rather than broiler flocks. In this study, 22 broiler flocks collected from slaughter house of Khorasan, Esfahan and Tehran provinces were examined by histopathology and PCR for detection of serotype-1 MD virus in spleen tissue. Six flocks (27%) showed positive PCR reactions, gross and microscopic lesions including red leg, swollen feather follicles and accumulation of lymphoblast in dermis. Eight flocks (36%) showed positive PCR assay without presence of gross or histopathology lesions .There was no evidence for diagnosis of MD among the eight rest flocks. Since MD could be ffully diagnosed in 27% of the studied flocks, it seems that the disease might play an important role in the development of immunosuppression syndrome among Iranian broiler chicken flocks. It is recommended to employ effective prophylactic measures to reduce economic losses.

Key Words: Marek disease ,Broiler chicken, PCR, Iran

مقدمه

بیماری مارک، یک عفونت لنفوپرولیفراتیو پرندگان بوده که با نفوذ سلول های تک هسته ای در سیستم اعصاب محیطی و ارگان های مختلف بدن و بافتهائی مانند : عنبیه و پوست مشخص می شود (۹،۱۰). ویروس بیماری مارک دارای سه سرو تیپ می باشد: سرو تیپ یک شامل کلیه سویه های بیماریزا است که این سویه ها خود به سویه های بسیار حاد ، حاد ومتوسط تقسیم بندی می شوند، سروتیپ دو شامل سویه هایی است که بطور طبیعی بیماریزا نبوده و تومور ایجاد نمی کنند و سروتیپ سه که شامل سویه های هر پس ویروس بوقلمون هستند (۱۲، ۹).این بیماری انتشار جهانی داشته و تقریباً از تمام دنیا گزارش شده است (۹،۱۲).

۱- دانش آموخته دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه ازاد اسلامی،واحد علوم و تحقیقات، تهران، تایران
۲ – بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، مشهد، ایران
۲ – دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی ، مشهد، ایران
٤- گروه پماریهای طیور، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

گرچه ویروس در ترشحات بینی ، نای و مدفوع نیز وجود دارد ولی سلول های اپی تلیال ریشه پرها و پرریزه ها (dander) بیشترین منبع عفونت می باشند که ویروس بصورت زایا در آنها وجود دارد، و تا یک سال در محیط باقی می ماند. بهترین راه ورود ویروس به بدن از طریق هوا و دستگاه تنفس است و از طریق تخم مرغ نیز به جوجه ها منتقل نمی شود (۱،۲،۱۲). فاکتورهائی که در اپیدمیولوژی و وقوع بیماری مؤثر هستند عبارتند از: وضعیت ژنتیکی، مقاومت ژنتیکی، جنسیت، سن، پادتن مادری، جنس ویروس و فاکتورهای دیگری از جمله تغییرات جیره غذائی، نقل و انتقال، واکسیناسیون، قطع نوک، ازدحام و ... (١٤). معمولاً بیماری به دو شکل کلاسیک و حاد بروز می کند و تشخیص بیماری بر اساس علائم بالینی، ضایعات ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک می باشد .یکی از دلایل عمده ای که سبب شده تا بیمای مارک همچنان بعنوان تهدیدی جدی در صنعت طیور مطرح باشد، پیدایش سویه های جدید با حدت بیشتر همراه با افزایش تعدد میزبان میباشد. عفونت های ویروسی همچون بیماری مارک، بیماری بورس عفونی، کم خونی عفونی جوجه ها سبب تضعیف و سرکوب سیستم ایمنی ماکیان میشود. تمامی این عوامل بواسطه تخریب لنفوسیت ها یا تغییر میزان سیتوکاین ها، سبب بی نظمی و بی کفایتی سیستم ایمنی می شوند .این بیماری درمرغ های گوشتی نه تنها گا هی به صورت بالینی بلکه بیشتر به صورت تحت بالینی اثرات سوء خود را به جا می گذارد. در بسیاری از مناطق جهان خسارات ناشی از مارک در مرغ های گوشتی در حال افزایش میباشد. تا جائیکه در امریکا و بسیاری از کشور های اروپائی، خاور میانه، خاور دور و افریقای جنوبی، واکسن مارک با استفاده از روش تزریق داخل تخم مرغ به صورت رایج در جوجه های گوشتی بکار می رود. این امر موجب ضریب محافظتی ۸۰تا درصدی بعد از برخورد با سویه حاد ویروس مارک در سه روز اول پس از خروج از تخم می شود (٦،٩).

در فاصله زمستان ۱۳۸۳ تا بهار ۱۳۸٤ گزارشاتی مبنی بر وجود مواردی مشکوک از فرم پوستی مارک در مرغ های گوشتی به مراکز علمی و اجرائی دامپزشکی ایران ارجاع شد. تحقیق فوق جهت پاسخگویی به این مشکل و احتمالاً اثبات بیماری مارک در مرغ های گوشتی، در سطح کشتارگاههای صنعتی استان خراسان، اصفهان و تهران با دو روش هیستو پاتولوژی و مولکولی صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

۱-گله های مرغ گوشتی :

این تحقیق بر روی ۲۲ گله مرغ گوشتی در سن کشتار، درکشتارگاههای صنعتی استان خراسان(۵گله)، اصفهان(۵گله) و تهران (۱۲گله) صورت پذیرفت. این گله ها از نظر وزنی یک دست نبوده و در بعضی موارد جراحات توموری در سطح پوست و فولیکو لهای پر مشاهده می شد.

۲-هیستوپاتولوژی:

از پوست، طحال، کبد، پانکراس، قلب و پیش معده لاشه های بررسی شده، برداشت انجام شد، سپس در فرمالین بافر ۱۰٪ قرار داده شد. بعد از انجام فیکساسیون، تهیه قالب های پارافینی و تهیه برش های به ضخامت ۵ میکرون، لام های تهیه شده با هماتوکسیلین وائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه و قرائت شد.

۳- استخراج DNA ویروس :

جهت جداسازی DNA ویروس مارک، از هر گله، ۱۰ پرنده انتخاب و از طحال آنها توسط دستگاه هموژنیزاتوردستی، سوسپانسیون بافت ۱۰٪ با استفاده از PBS تهیه شد.این سوسپانسیون سه بار منجمد و ذوب شد و با دور rpm ٦۰۰۰ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برداشت شده و جداسازی DNA، با استفاده از کیت جدا سازی اسید

نوکلئیک ویروسی انجام گرفت (Roche-Germany). به طور خلاصه، میزان چهار میکرولیتر از محلول آدینیلیک اسید (Poly A) و ۲۰۰میکرولیتر از Binding buffer در یک تیوپ ۱/۵ میلی لیتری مخلوط شد و بعنوان working solution مورد استفاده قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع روئی سوسپانسیون تهیه شده به محلول فوق افزوده شد. پس از مخلوط نمودن ۵۰ میکرولیتر از محلول Proteinase K جهت لیزسلولی افزوده شد. محلول در بن ماری ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت۱۰دقیقه قرار داده شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به تیوب افزوده گردید. سپس نمونه از فیلتر تیوب با سانتریفوژ در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت یک دقیقه عبور داده شد. بدین ترتیب DNA جذب فیلتر شد، سپس بعد از تعویض Collection tube به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از Inhibitor removal buffer بر روی فیلتر افزوده شد و مجدداً در rpm ۸۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از تعویض Collection tube ٤٥٠ میکرو لیتر از بافر مخصوص شستشو افزوده شد. پس از تکرار مراحل سانتریفوژ و شستشو، تیوب حاوی DNA در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت یک دقیقه وبعد در دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ شد. پس از حذف Collection tube به میزان ۵۰ میکرولیتر از Elution buffer بر روی فیلتر افزوده در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. بدین ترتیب استخراج DNA انجام پذیرفت.در ضمن از واکسن Rispens بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید .

٤- آزمایش PCR :

واکنش برای ۵۰ میکرولیتر که حاوی ۱/۵ میلی مول منیزیم کلراید ،۲۰۰ میکرومول مخلوط dNTPs، ۱۵ پیکو مول از هر یک از پرایمرهای منتشر شده (٤) با توالی نوکلئوتیدی به صورت زیر :

Forward primer : 5′- CAT GCA AGT CAT TAT GCG TGA - 3 ′
Reverse primer : 5′ - TGT TTC CAT TCT GTC TCC AAG A – 3′

۲/۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز و ۲ میکرولیتر DNA بود انجام شد . این واکنش توانائی تکثیر قطعه DNA ویروس بیماری مارک سروتیپ یک با اندازه ۱۹۹ جفت باز را داشت که با برنامه ۹٤ °C (۱′) ، ۵۵ °C (۳۰") و ۷۲ °C (۱′) برای ۳۰ سیکل انجام شد . جهت تأئید وجود محصولات PCR در واکنش، ابتدا ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید تهیه و میزان ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR به همراه مارکر DNA ۱۰۰جفت بازی الکتروفورز گردید.

نتایج

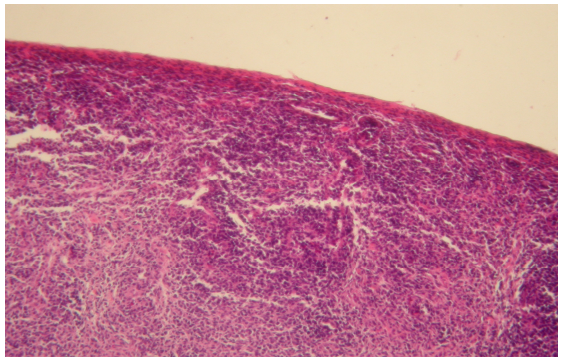
۱- مشاهدات ماکروسکوپیک :

تمام گله های مورد بررسی عدم یکنواختی از نظر وزن و پائین تر بودن وزن از نظر استاندارد را نشان دادند،همچنین درجات شدید تا ضعیف آتروفی تیموس بصورت ثابت در لاشه های بررسی شده مشاهده گردید. در ٦ گله، بزرگ شدن خفیف تا ندولهای توموری با اندازه های متفاوت در قاعده فولیکول های پر و نیز در برخی سرخی (Erythematous) در قسمت ساق پا دیده شد. (نگاره ۱ و جدول ۱)

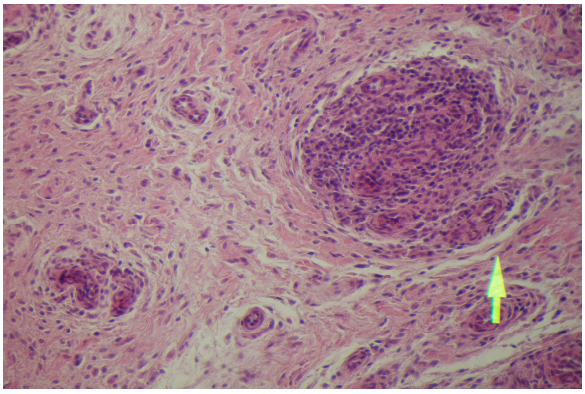
نگاره ۱ : ضایعات پوستی در قاعده فولیکول های پر (مارک پوستی)

۲- *مشاهدات میکروسکوپیک :*

در پوست نمونه های مشکوک بـه مـارک پوسـتی، تجمـع سلول های چنـد شـکلی (پلـی مورفیـک لنفوبلاسـتیک) در اطراف فولیکول های پر و پیرامون عروقی که گاهی همراه با دژنرسانس آبکی سلولهای پوششی فولیکول پرها همراه بود، مشاهده شد. نفوذ سلولهای نئوبلاستیک لنفوئیدی در ناحیـه درم پوست به شکل منتشر و در برخی نمونه هـا بـه شـکل کانونی قابل مـشاهده بـود.وجـود علائـم ماکروسـکوپیک و میکروسکوپیک بیماری مارک پوستی در گله های E5, E4 , E3, E2 , M1 و T1 (شـش گلـه) مـشاهده گردیـد. (نگاره ۲ و ۳ و جدول ۱). در بافت های کبد، قلـب، پـیش معده و پانکراس ضایعه ای خاص مشاهده نگردید.



نگاره ۲ : نفوذ منتشر سلول های نئوبلاستیک لنفوئیدی در ناحیه درم پوست(H&E× ۱۶۰)



نگاره۳ : نفوذ کانونی سلولهای نئوپلاستیک لنفوئیدی در ناحیه درم پوست پیکان(۴۰۰ H&E×)

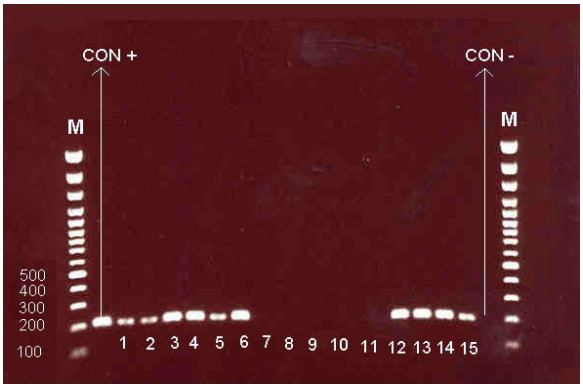
۳ – *واکنش PCR :*

از ۲۲ گله مورد بررسی قـرار گرفتـه، واکـنش PCR در ۱۴ گله مثبت ارزیابی شد که از این میان، شش گله دارای علائم ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک بیماری و هشت گله بدون علائم ماکروسکوپیک و میکروسـکوپیک بیمـاری بودنـد.در هـشت گلـه باقیمانـده نـه تنهـا علائـم ماکروسـکوپیک و میکروسکوپیک مثبت ارزیابی نشد، بلکـه واکـنش PCR در آنها نیز منفی بود (جدول ۱ و نگاره۴).لذا ۲۷ درصـد نمونـه های بررسی شده از نظر بالینی و آزمایـشگاهی بـه بیمـاری مـــــــــــــارک مبـــــــــــــتلا بودنـــــــــــــد.

جدول ۱: نتایج PCR به همراه نتایج مشاهدات ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک

نمونه ها	علائم ظاهری مارک جلدی	نتیجه مشاهدات میکروسکوپیک	نتیجهPCR
T1 M1 E5, E4 , E3, E2	+	+	+
M5 M2 , T11 , T7 , T6, T3 , T2 , E1	–	–	+
T4,T5,T8,T9,T10,T12,T13,T14,T15,T16,T17,M3 ,M4	–	–	–

(+: مثبت)، (– : منفی)، (T: تهران)، (M: مشهد)، (E: اصفهان)



نگاره٤: نتایج واکنشPCR برای ویروس بیماری مارک در تعدادی از گله های بررسی شده نمونه های ۱ تا ۱۵ مربوط به نمونه های تعدادی از گله های مشکوک در این مطالعهM: مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی+CON: کنترل مثبت، -CON : کنترل منفی

بحث

خسارات اقتصادی ناشی از بیماری مارک الزاماً با تظاهرات بالینی همراه نیست بلکه عمده زیان ها بصورت مخفی و پنهان می باشد. مروری بر تاریخچه بیماری مارک، بیانگر این حقیقت است که ویروس هایی با حدت فزاینده تقریباً هر ده سال یکبار پدیدارمی شوند که این ویروس ها حتی با تجویز قوی ترین واکسن های موجود نیز مهار نمی شوند بنابراین چنین می توان گفت که طول عمر مفید هر سویه واکسن جدید یا واکسن های ترکیبی، درحدود ۱۰سال است. واکسن HVT (FC-126) بطور گسترده و مؤثری در دهه ۱۹۷۰ در امریکا مورد استفاده قرار گرفت. با شناسایی سویه جدید و حاد ویروس این بیماری در امریکا دیگر، واکسن HVT قادر به ایجاد پیشگیری و حفاظت کامل نبود. در اواسط ۱۹۹۵ در امریکا واکسن تخفیف حدت یافته (CVI-988/Rispens) تهیه شد ولی ویروس های مزرعه ای اخیر نه تنها از نظر بیماریزایی بلکه از نظر ایجاد تظاهرات توموری در مرغ های گوشتی نیز مطرح شده اند (۷،۱۲). ویروس بیماری مارک از نظر بیماریزایی، انتشار در بافت ها، طیف میزبانی دچار تغییر و تحولاتی شده است که این تغییرات کماکان ادامه دارد تا جائیکه در جوجه های عاری از پاتوژنهای اختصاصی و حتی سرم انسان نیز گزارش شده است (۷، ۸). جوجه ها با یا بدون علائم بالینی، ویروس را پخش می کنند، صرف جداسازی ویروس یا نشان دادن آنتی بادی دلیل بر تأیید تشخیص این بیماری نمی باشد، لذا وجود ضایعات به همراه یافته های فوق میتواند ارزشمند باشد (۱۳). در این تحقیق از روش PCR که روشی بسیار ارزشمند برای مونیتورینگ می باشد استفاده گردید(۵،۱۱). ردیابی سروتیپ یک ویروس بیماری مارک همراه با ضایعات ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک که در ٦ گله مشاهده گردید از ارزش خاصی می تواند برخوردار باشد. با توجه به این یافته ی مهم و عدم واکسیناسیون بر علیه بیماری در گله های مرغ گوشتی ایران، اشکال در حال کمون بیماری و اثرات مضر این بیماری در گله های مرغ گوشتی متبادر به ذهن می شود. اگرچه بطور قاطع نمی توان تداخل ویروس های واکسنی در حال گردش در فیلد را رد نمود. نتایج این تحقیق بعنوان یک تحقیق مقدماتی میتواند برای ارزیابی عفونت درایران مفید واقع شود. اثرات سینرژیسم این ویروس با دیگر ویروس های تضعیف کننده سیستم ایمنی مانند ویروس بورس عفونی، ویروس کم خونی عفونی، رئوویروس ها، آدنو ویروس ها و اثرات سوء تحت بالینی آنها، در دیگر کشورها بررسی شده است(۵،٦)، ولی در ایران تا کنون گزارشی در این زمینه موجود نمی باشد. به نظر می رسد بررسی سایر عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی ماکیان در گله های مورد مطالعه بتواند توجیه دقیق تری از عوامل مسبب در ایجاد جراحات بیان شده به دست بدهد. تلاش برای چنین بررسی در دست انجام می باشد. بعلت افزایش حدت ویروس در چهاردهه اخیر و اثرات مخرب آن بر سیستم ایمنی و مستعد شدن پرنده به عوامل عفونی دیگر، مطالعات بسیاری در سطح مزارع گوشتی انجام شده است تا سطح مصونیت حاصل از واکسیناسیون بر علیه این بیماری که پیش از خروج جوجه از تخم (in ovo) انجام میشود، مورد بررسی قرار گیرد. در این روش فاصله زمانی بین واکسیناسیون و رویاروئی پرنده

با عفونت در ابتدای ورود به سالن به حداکثر میرسد، زیرا در این روش، واکسن در سن ۱۸ روز گی دوره جنینی تلقیح شده و به دلیل تکثیر سریعتر ویروس واکسن در تخم مرغ، ویرمی زودرسی را سبب میشود و مصونیت بهتری در برابر چالش ویروس در روز سوم پس از تولد ایجاد می نماید (۱،۳،٤،٥). از آنجائیکه واکسیناسیون بر علیه این بیماری در گله های مرغ گوشتی در ایران انجام نمی پذیرد بنظر می رسد ردیابی سروتیپ یک این ویروس به همراه ضایعات آسیب شناسی در ۲۷ درصد موارد برسی شده می تواند هشداری برای گله های مرغ گوشتی باشد و به نظر میرسد باید در ایران نیز راهکاری برای پیشگیری از این بیماری در گله های مرغ گوشتی اتخاذ گردد.

فهرست منابع

1.Gildersleeve. *et all* (1997): Comparative field studies post hatch virus in ovo MD vaccination, World Poultry ,Elsevier. 29-31

2.Ihara, T., Kato, A., Ueda, S., Ishihama, A. & Hirai, K. (1989): Comparison of the sequence of the secretory glycoprotein A (gA) gene between Md5 and BC-1 strains of Marek's disease virus type 1. Virus Genes*, 3*, 125–137.

3.Isabel M. Gimeno. (2004): Bio characteristics shared by highly protective Vaccines against Marek's disease .Avian Pathology.33(1), 59 -68

4.Islam1 A. F. M. F. (2001): Influence of vaccine deposition site on post-vaccinal viraemia and vaccine efficacy in broiler chickens following *in ovo* vaccination against Marek's disease. Avian Pathology 30, 525 – 533

5.Islam1 A. F. M. F. (2001): Marek's disease in broiler chickens: effect of route of infection and herpesvirus of turkey-vaccination status on detection of virus from blood or spleen by polymerase chain reaction, and on weights of birds, bursa and spleen. Avian Pathology. 30, 621– 62

6.Islam1A. F. M. F., (2002): Immunosuppressive effects of Marek's disease virus (MDV) and herpesvirus of turkeys (HVT) in broiler chickens and the protective effect of HVT vaccination against MDV challenge. Avian Pathology 31, 449– 46

7.Laurent .S. (2001): Detection of avian oncogenic Mareks disease herpesvirus DNA in human sera. Journal of General Virulugy. 82:233-240

8.Miles, A; Reddy, M (2001) .Coinfection of specific pathogen free chickens with Marek's disease virus (MDV): and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. Avian Dis.45:9–18.

9.Payne, l.n. MA (1985): Mareks disease. Scientific Basis and Methods of control. Marinus Nijhoff publishing. Boston;1-17

10. Saif.Y (2003): Mareks disease. Diseases of poultry. Iowa state press.11th. Edition: 407-446.

11. Salisbury. Jonathan R. (1997): Molecular Pathology Kings College. London UK Copyright Taylor &Francis LTD.1-18

12. Sanjay. M. (1997): Mareks disease virus as an Evolving pathogen supplement of World Poultry. Elsevier ;13-14

13. Swayne. D. (1998): Mareks disease .A Laboratory manual for the isolation and identification of Avian Pathogens .American Association of Avian Pathologists. 116 -124

14. Vegad. j, L (2001): Mareks disease. A textbook of Veterinary Special Pathology. 172-180.