

ردیابی مولکولی ویروس مارک در ماکیان خانگی با ضایعات ندولی در ارگان‌های احشایی

مجید غلامی آهنگران*^۱، الهام مقتدایی خوراسگانی^۲، آسیه احمدی دستگردی^۳

۱- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- استادیار گروه صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mgholamia1388@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۱۱/۹ پذیرش نهایی: ۹۸/۲/۱۱)

چکیده

بیماری مارک یکی از بیماری‌های مهم تضعیف‌کننده سیستم ایمنی در صنعت پرورش مرغ تخم‌گذار است که می‌تواند ضایعات لنفوپرولیفراتیو در اندام‌های مختلف احشایی ایجاد کند. شناسایی هر چه سریع‌تر این بیماری در طیور تخم‌گذار مانع از صرف هزینه‌های درمانی و تصمیم‌گیری سریع در خصوص اقدامات کنترلی و امنیت زیستی علیه این بیماری می‌گردد. در این راستا به منظور شناسایی ویروس مارک در ضایعات ندولی در احشای ماکیان خانگی و تمایل بافتی ویروس مارک، از ۵۰ قطعه پرنده مشکوک به بیماری مارک که دارای ضایعات ندولی در احشاء بودند، نمونه‌های مختلف بافتی ضایعه‌دار و بدون ضایعه اخذ شد. پس از استخراج DNA از نمونه‌های بافتی، بر اساس توالی آنتی‌ژن A، یک قطعه با اندازه ۳۱۴ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی و با استفاده از آزمایش PCR (polymerase chain reaction) تکثیر شد و به شناسایی موارد آلوده و توزیع بافتی ژن کدکننده آنتی‌ژن A ویروس مارک در تمامی نمونه‌ها پرداخته شد. علاوه بر آن، به منظور تفریق سویه‌های بیماری‌زا از غیر بیماری‌زا، قطعه ۴۳۴ جفت بازی تکرارشونده نیز با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی تکثیر شد. نتایج نشان داد در تمامی موارد آلوده به ویروس مارک، در مرحله تومورزایی، ژن کدکننده آنتی‌ژن A در بافت‌های ضایعه‌دار و بدون ضایعه قابل ردیابی است. علاوه بر آن، تمامی نمونه‌های مثبت از نظر ویروس مارک، متعلق به پاتوتیپ‌های بیماری‌زا می‌باشند. لذا به نظر می‌رسد که در مرحله تومورزایی بیماری مارک، صرف نظر از وجود یا عدم وجود علائم ماکروسکوپی در لاشه پرنده‌گان، در تمامی بافت‌ها ژن کدکننده آنتی‌ژن A ویروس مارک قابل ردیابی است. کلیدواژه‌ها: ویروس مارک، ضایعات ندولی، ردیابی مولکولی، ماکیان خانگی.

مقدمه

نشانه‌های بالینی بیماری می‌توان به درگیری اعصاب و بروز فلجی بال و پاها، فلجی و اتساع چینه‌دان به همراه تنفس با دهان باز، پیچش گردن، اسهال و لاغری اشاره نمود (Singh *et al.*, 2012; Schat and Nair, 2013). عوامل مربوط به میزبان و محیط مانند جنس، سن، ایمنی، شدت بیماری، تراکم و استرس محیطی می‌تواند در بروز بیماری دخیل باشند (Schat and Nair, 2013). مهم‌ترین راه ورود ویروس دستگاه تنفس می‌باشد، ولی ویروس از راه چشم، بینی و حلق نیز وارد بدن پرنده حساس می‌شود. انتقال عمودی ویروس رخ نمی‌دهد. تشخیص اولیه بیماری بر اساس نشانه‌های بالینی، جراحات کالبدگشایی و هیستوپاتولوژی امکان‌پذیر است. برای تأیید تشخیص می‌توان از جداسازی و شناسایی ویروس و آزمایش‌های سرولوژی استفاده کرد. هر چند پستانداران در عفونت تجربی نسبت به ویروس عامل بیماری مارک پرنده‌گان مقاوم می‌باشند، اما احتمالاً تحقیق بر روی این ویروس می‌تواند به عنوان مطالعات پایه در زمینه شناخت بیشتر سرطان‌های با منشأ ویروس در انسان مورد استفاده قرار بگیرد (Schat and Nair, 2013).

روش‌های تشخیصی برای تأیید بیماری شامل جداسازی ویروس، شناسایی آنتی‌ژن‌های ویروسی و روش‌های سرولوژی شامل ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) و AGID (agar gel immuno-diffusion) می‌باشد (Becker *et al.*, 1992) اما به دلیل وجود واکنش‌های متقاطع در بین سروتیپ‌ها، با روش‌های ذکر شده نمی‌توان بیماری مارک را به‌طور قطعی تشخیص داد. حتی به‌دنبال جداسازی ویروس در کشت سلول به دلیل خنثی شدن ویروس‌های سروتیپ ۲

بیماری مارک نوعی بیماری لنفوپرولیفراتیو در ماکیان می‌باشد که با افزایش و نفوذ سلول‌های تک هسته در اعصاب محیطی و اندام‌های احشایی پرنده‌گان مشخص می‌شود و به اسامی پلی‌نوریت (polyneuritis) و نوریت (neuritis) نیز معروف است. این بیماری در سرتاسر جهان وجود داشته و ماکیان مهم‌ترین میزبان عامل این بیماری ویروسی می‌باشند، اما علاوه بر ماکیان، بلدرچین، بوقلمون و قرقاول نیز به این بیماری مبتلا می‌شوند. عامل بیماری مارک، آلفا هرپس ویروسی است که وابسته به هسته سلول میزبان است. ژنوم ویروس از نوع دزوکسی ریونوکلیک اسید دو رشته‌ای خطی می‌باشد (Schat and Nair, 2013). این بیماری با ایجاد لنفوم در ارگان‌های مختلف، باعث کم‌خونی و تضعیف سیستم ایمنی در طیور بالغ تخم‌گذار و مرغ مادر می‌شود. لذا بیشترین اهمیت اقتصادی این بیماری در ایجاد تلفات و کاهش تولید تخم مرغ خوراکی و تخم مرغ‌های نطفه‌دار در گله‌های مرغ مادر می‌باشد (Singh *et al.*, 2012). اولین بار این بیماری در سال ۱۹۰۷ توسط فردی به نام مارک در یک خروس با علائم عصبی توصیف شد. ویروس عامل بیماری می‌تواند چهره‌های مختلف بالینی ایجاد کند. فرم‌های حاد کلاسیک احشایی، جلدی، چشمی و عصبی از فرم‌های شایع و معمول بیماری هستند، اما وخیم‌ترین و مهم‌ترین فرم بیماری مارک در گله‌های طیور فرم حاد کلاسیک با علائم لنفوم در ارگان‌های احشایی شبیه قلب، کبد، کلیه، تخمدان، ریه، طحال، بورس، عضلات، پوست، پیش معده و پانکراس می‌باشد (Schat and Nair, 2013; Boodhoo *et al.*, 2016). از مهم‌ترین

توزیع بافتی ویروس مارک در ارگان‌های مختلف پرندگان آلوده وجود ندارد. لذا مطالعه اخیر به منظور شناسایی سهم ویروس عامل بیماری مارک در ایجاد ضایعات ندولی در ماکیان خانگی به انجام رسید.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری: از بهار سال ۱۳۹۳ تا بهار سال ۱۳۹۷ از ۵۰ قطعه مرغ خانگی که با علائم لاغری مفرط، بی‌اشتهایی، رنگ پریدگی تاج و غنغب و در برخی موارد برجستگی‌های پوستی به کلینیک دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مراجعه نمودند، تاریخچه‌گیری شده و در صورت وجود تلفات، کالبدگشایی به عمل آمد. از پرندگانی که در کالبدگشایی علایم برجستگی به شکل ندول در ارگان‌های احشایی یا پوستی نشان دادند، با استفاده از فرمالین ۱۰ درصد به منظور بررسی مقاطع میکروسکوپی بافتی نمونه‌گیری به عمل آمد (Bancroft *et al.*, 1996). علاوه بر آن، به منظور بررسی توزیع بافتی ویروس و ضایعات در سایر ارگان‌ها، نمونه‌های بافتی از سایر ارگان‌های به ظاهر سالم نیز به شکل مجزا اخذ شده و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری گردید. نمونه‌های بافتی اخذ شده شامل کبد، طحال، بورس فابرسیوس، عصب سیاتیک، پوست، پیش‌معه، عضله اسکلتی سینه، عضله قلب، تیموس، ریه و لوزه سکومی بودند. علاوه بر نمونه‌های پاتولوژیک، از تمامی بافت‌های توموری و نیز بافت‌های به ظاهر سالم برای آزمایشات مولکولی نمونه‌برداری انجام گرفته و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در ابتدا به منظور شناسایی بیماری مارک در موارد ارجاعی، نمونه‌های توموری مورد بررسی

و ۳ با آنتی‌بادی‌های ضد سروتیپ یک، تشخیص قطعی با مشکل مواجه می‌شود (Schat and Nair, 2013). بنابراین تشخیص قطعی آلودگی فقط از طریق آزمون‌های مولکولی امکان‌پذیر است و لذا در مطالعه اخیر از تکنیک PCR (polymerase chain reaction) به منظور شناسایی موارد آلودگی استفاده شده است.

قطعه ۱۳۲ جفت بازی تکرارشونده در سویه‌های مختلف سروتیپ ۱ ویروس مارک به تعداد مختلفی تکرار می‌شود و از این جهت به آن تکرارشونده می‌گویند که بسته به تعداد دفعات تکرار آن می‌توان سویه‌های بیماری‌زا را از سویه‌های غیر بیماری‌زا تفریق کرد. در ویروس‌های بیماری‌زا، ردیف ۱۳۲ جفت بازی تنها دو یا سه بار تکرار می‌شود. به عبارتی وجود باند ۴۳۴ جفت بازی نشان‌دهنده دو نسخه از ردیف ۱۳۲ جفت بازی است (دو قطعه ۱۳۲ جفت بازی به علاوه قطعه ۱۷۰ جفت بازی احاطه کننده، جمعاً باند ۴۳۴ جفت بازی را تولید می‌کنند). در سویه‌های غیربیماری‌زا تعداد نسخه‌های ردیف ۱۳۲ جفت بازی تکرارشونده بیشتر است و قطعه ۴۳۴ جفت بازی حاصل نمی‌شود (Balena *et al.*, 2019, Mohammadi *et al.*, 2005; Kalyani *et al.*, 2011). لذا بر این اساس می‌توان پرایمرهایی را طراحی نمود تا در تفریق سویه‌های بیماری‌زا از غیر بیماری‌زا کمک‌کننده باشند که در مطالعه اخیر از آن‌ها استفاده شده است. اگرچه در خصوص شناسایی این ویروس در فارم‌های گوشتی و تخم‌گذار صنعتی گزارش‌های متنوعی وجود دارد، اما با توجه به بروز ضایعات ندولی در مرغان خانگی تاکنون مطالعه مدونی در خصوص نقش ویروس عامل بیماری مارک در شکل‌گیری این ضایعات در پرندگان خانگی و

مولکولی (polymerase chain reaction; PCR) قرار گرفتند و در صورتی که لاشه مورد نظر از لحاظ مارک مثبت بود، سایر ارگان‌های احشایی شامل عضله، کبد، پوست، عصب سیاتیک، تیموس، طحال، بورس فابریوس، پیش‌معدة، ریه، قلب و کلیه نیز مورد بررسی واقع شدند. لازم به ذکر است که تمامی مراحل انجام PCR در مرکز تحقیقات مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد.

- استخراج DNA نمونه‌های بافتی و انجام PCR: DNA نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش فنل-کلورفرم (سیناژن، ایران) انجام شد. برای استخراج DNA از نمونه‌های بافتی، ۲۰۰ میکرولیتر پروتئیناز k (۲۰۰ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر) به مخلوط اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و سپس ۵ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از ته‌نشین کردن DNA با اتانول، مقدار ۳۰ میکرولیتر آب DNAase free به آن اضافه شد و در فریزر -۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. جهت تکثیر قطعه ژنی کدکننده آنتی‌ژن A ویروس مارک و قطعه 132bp Tandem Repeat ویروس مارک از ۲ زوج پرایمر اختصاصی که در مطالعات قبلی منتشر

شده (Doosti *et al.*, 2011) و توالی آن در جدول ۱ آمده است، استفاده شد و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شد. به منظور اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها، توالی پرایمرها در سرورس Blast (سایت NCBI) جستجو شد. جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر ژن‌های مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر Mastercycler (اپندورف، آلمان) استفاده شد. میکروتیوب استفاده شده بدین منظور، با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکروگرم از DNA الگو و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر منیزیم کلراید و ۲۰۰ میکرولیتر از dNTP و ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X ویژه PCR و ۱ میکرولیتر آنزیم Taq (Fermentas) بود. برنامه حرارتی مورد استفاده هم شامل یک سیکل با دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل تکراری شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس در ۱ دقیقه، همسرشت‌سازی در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی بیماری مارک (Becker *et al.*, 1992)

| ژن‌های هدف | توالی جفت پرایمرهای استفاده‌شده در PCR | طول قطعه محصول PCR (جفت باز) |
|---------------------|---|------------------------------|
| Antigen A | F: 3'-GAG GTA CCT CAT GGA CGT TCC ACA-5' R: 3'-ACA TTC TTT TCG TTG GCG TGG TAT-5' | ۳۱۴ |
| Tandem Repeat 132bp | F: 5'- TAC TTC CTA TAT ATA GAT TGA GAC GT-3' R: 5'- GAG ATC CTC GTA AGG TGT AAT ATA-3' | ۴۳۴ |

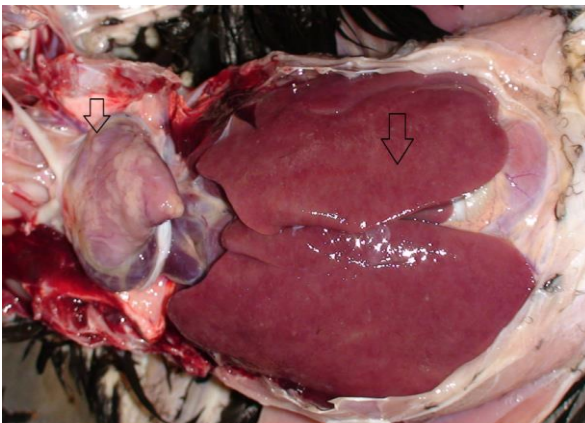
سپس ژل مورد نظر با اتیدیم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه UV doc (UVITEC، انگلیس) مشاهده شد.

در نهایت محصولات PCR روی ژل ۱ درصد آگارز با ولتاژ ۸۰ ولت برای مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردیده و

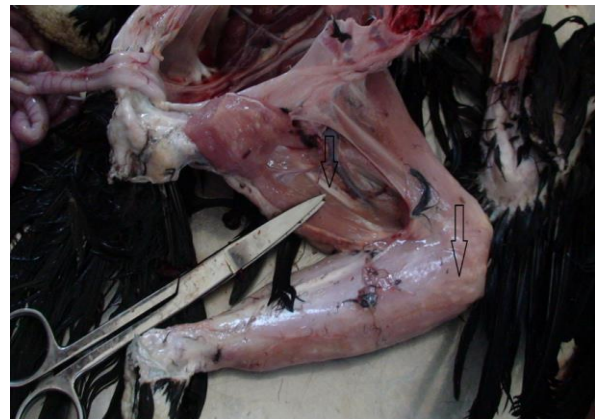
یافته‌ها

- مشخصات ماکروسکوپی: در بررسی‌های ماکروسکوپی، در عضلات ران و سینه نقاط سفید رنگ به صورت منتشر بر روی سطح عضلات به همراه بزرگ‌شدگی عصب سیاتیک مشاهده شد (شکل ۱). کبد کم رنگ‌تر از حالت طبیعی و بزرگ و متورم بود. همچنین نقاط سفید رنگ به صورت منتشر در آن دیده شد. قلب نیز دارای نقاط سفید رنگ و برجسته بود (شکل ۲).

- آسیب‌شناسی بافتی نمونه‌ها: برای انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی، نمونه‌های بافتی در فرمالین ۱۰ درصد جمع‌آوری شده و ۲۴ ساعت پس از نمونه‌گیری، فرمالین تعویض شد. نمونه‌ها پس از پارافینه‌شدن و تهیه مقاطع بافتی به ضخامت ۴ میکرون، به‌روش هماتوکسیلین-ئوزین (Merck، آلمان) رنگ‌آمیزی شدند (Bancroft et al., 1996).



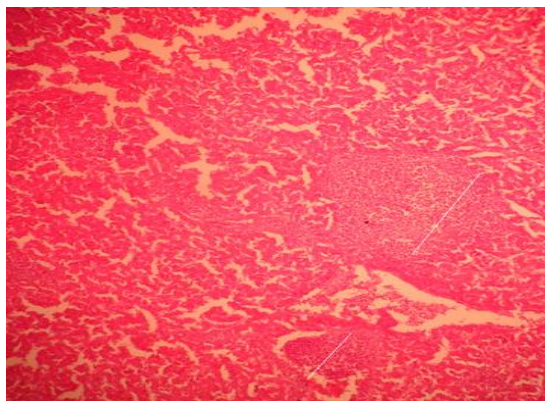
شکل ۲- ضایعات ماکروسکوپی در کبد و قلب پرنده مبتلا به بیماری مارک



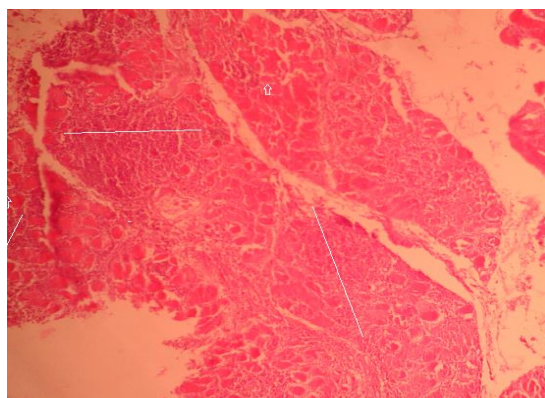
شکل ۱- ضایعات ماکروسکوپی در عضله و عصب پرنده مبتلا به بیماری مارک

پلئومورفیک لنفوسیتیک به صورت کانونی و منتشر بود (شکل ۴). در پیش‌معه نیز پرولیفراسیون سلول‌های لنفوئیدی پلئومورفیک منتشر توموری، در اطراف غدد و لوبول‌های پیش‌معه دیده شد (شکل ۵).

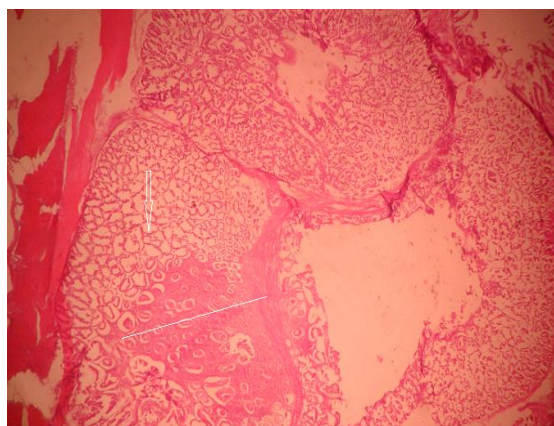
- مشخصات میکروسکوپی ضایعات در نمونه‌های بافتی: در بررسی مقاطع میکروسکوپی، کبد واجد کانون‌های نئوپلاستیک همراه با سلول‌های پلئومورفیک شامل لنفوبلاست‌ها و لنفوسیت‌ها با اندازه‌های مختلف کوچک تا متوسط بود (شکل ۳). عضلات اسکلتی نیز واجد کانون‌های نئوپلاستیک شامل سلول‌های



شکل ۳- نمای ریزبینی مربوط به کبد یک پرنده مبتلا به مارک. محل ضایعه با خط سفید در شکل نمایش داده شده است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی $10\times$).



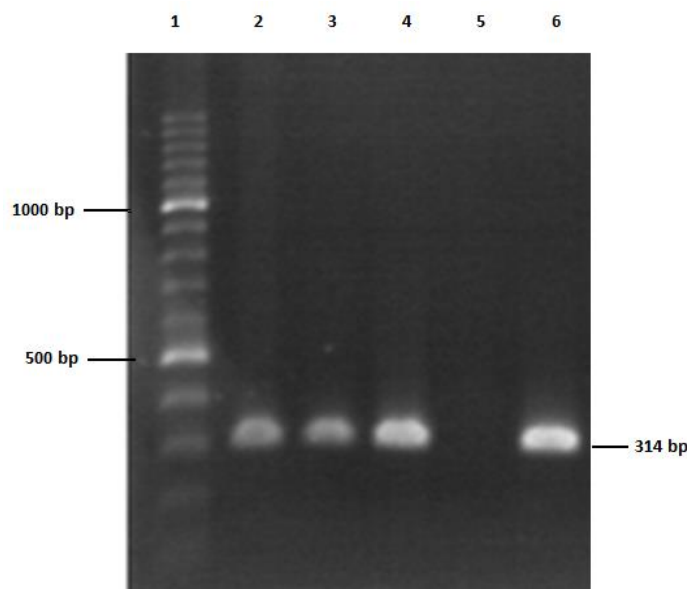
شکل ۴- نمای ریزبینی مربوط به عضله اسکلتی یک پرنده مبتلا به مارک. محل ضایعه با خط سفید و مقطع عضله با پیکان در شکل نمایش داده شده است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی $10\times$).



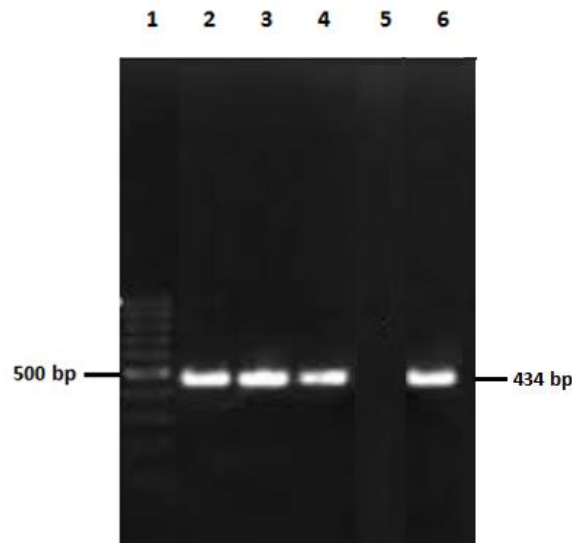
شکل ۵- نمای ریزبینی مربوط به پیش معده یک پرنده مبتلا به مارک. محل ضایعه با خط سفید و آتروفی غدد پیش معده با پیکان در شکل نمایش داده شده است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی $10\times$).

ردیابی شد (شکل ۶). بررسی نمونه‌های مثبت با پرایمر اختصاصی ژن کدکننده قطعه تکرارشونده ۱۳۲ جفت بازی هم نشان داد که در تمامی نمونه‌های مذکور، قطعه ۴۳۴ جفت بازی مورد تکثیر قرار گرفت (شکل ۷)، حال آن‌که در کنترل مثبت (واکسن HVT+Rispens) قطعه ۴۳۴ جفت بازی مربوط به ژن کدکننده قطعه تکرارشونده ۱۳۲ جفت بازی مشاهده نشد.

- **تشخیص مولکولی:** نتایج PCR مربوط به ردیابی ژن کدکننده آنتی‌ژن A در ارگان‌های مختلف پرندگان مورد آزمایش شامل کبد، طحال، بورس فابرسیوس، عصب سیاتیک، پوست، پیش‌معه، عضله اسکلتی سینه، عضله قلب، تیموس، ریه و لوزه سکومی نشان داد که قطعه ۳۱۴ جفت بازی در تمامی نمونه‌های اخذشده از پرندگانی که از لحاظ بافت شناسی، بیماری مارک در آن‌ها مثبت ارزیابی شده است، تکثیر شد و همانند کنترل مثبت (واکسن HVT+Rispens) این ژن



شکل ۶ - الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن کدکننده آنتی‌ژن A در نمونه‌های بالینی مورد آزمایش (ستون ۱: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas)، ستون ۲ تا ۴: باند ۳۱۴ جفت بازی ژن کدکننده آنتی‌ژن A در نمونه‌های مثبت، ستون ۵: کنترل منفی، ستون ۶: باند ۳۱۴ جفت بازی ژن مورد نظر در کنترل مثبت واکسن HVT- Rispens).



شکل ۷- الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن کدکننده قطعه تکرارشونده ۱۳۲ جفت بازی در نمونه‌های بالینی مورد آزمایش (ستون ۱: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas)، ستون ۲ تا ۴: باند ۴۳۴ جفت بازی ژن کدکننده قطعه تکرارشونده ۱۳۲ جفت بازی در نمونه‌های مثبت، ستون ۵: کنترل منفی، ستون ۶: باند ۴۳۴ جفت بازی ژن مورد نظر در کنترل مثبت).

در گسترش هرچه بیشتر این بیماری در منطقه نقش دارد. لذا آموزش مستمر و از طرفی بهره‌گیری از فن‌آوری‌هایی که باعث تشخیص سریع و دقیق این بیماری می‌گردد مانند آزمون PCR در کنترل این بیماری نقش قابل توجهی دارد.

در مطالعه اخیر از ۵۰ قطعه مرغ خانگی نمونه‌برداری شده، ۳۵ قطعه در آزمایش PCR و آسیب‌شناسی بافتی، مبتلا به بیماری مارک ارزیابی شدند (۷۰ درصد). قبلاً در ایران، سهم ویروس مارک در ضایعات توموری در فارم‌های گوشتی را حدود ۶۲ درصد (Doosti *et al.*, 2011) و در فارم‌های تخم‌گذار تجاری حدود ۴۷ درصد (Mohammadi *et al.*, 2005) گزارش کردند. به‌هرحال، بهداشت ضعیف و عدم انجام واکسیناسیون مناسب علیه این بیماری در کلنی‌های خانگی می‌تواند توجه‌کننده این اختلاف باشد. آلودگی

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری مارک سالانه در جهان ۱-۲ بلیون دلار به صنعت طیور خسارت وارد می‌کند (López-Osorio *et al.*, 2017). در خصوص خسارت ناشی از این بیماری در ایران اطلاعاتی در دست نیست اما به نظر می‌رسد یکی از عوامل تاثیرگذار بر تولید تخم‌مرغ در فارم‌های تخم‌گذار باشد. عموماً جوجه‌های تخم‌گذار در هچری علیه این بیماری واکسینه می‌شوند (Schat *et al.*, 2013) اما متأسفانه در ماکیان خانگی واکسیناسیون درستی علیه این بیماری انجام نمی‌شود. لذا نگهداری ماکیان خانگی در مناطق پرورش طیور صنعتی می‌تواند در گسترش این بیماری نقش عمده‌ای داشته باشد. عدم اقدامات پیشگیرانه موثر علیه این بیماری به دلیل سطح دانش ناکافی پرورش‌دهندگان ماکیان خانگی مانند عدم رعایت اصول امنیت زیستی و عدم انجام واکسیناسیون

قطعه تکرار شونده ۱۳۲ جفت بازی استفاده شد (جدول ۱). با توجه به اینکه در آزمایش PCR در تمام نمونه‌های بافتی اخذ شده از پرندگان مبتلا، قطعه ۴۳۴ جفت بازی مربوط به ردیف تکرار شونده ۱۳۲ جفت بازی هم تکثیر شده، لذا بیماری‌زایی تمامی سویه‌ها از لحاظ مولکولی نیز مورد تایید قرار می‌گیرد. در مطالعه اخیر اگرچه در تمام نمونه‌های استخراج شده از پرندگان واجد ضایعه توموری، قطعه ۴۳۴ جفت بازی که نشان‌دهنده بیماری‌زایی سویه‌های آلوده‌کننده می‌باشد، ردیابی شد اما این قطعه در DNA استخراج شده از واکسن غیربیماری‌زای مارک ردیابی نشد که می‌تواند صحت‌ای بر بیماری‌زایی سویه‌های ردیابی شده در پرندگان واجد علائم باشد. علاوه بر تایید مولکولی، از نظر بالینی نیز علاوه بر وجود لنفوم در ارگان‌های مختلف، وضعیت تخم‌گذاری طیور در فارم‌های آلوده متاثر گردیده است که شامل کاهش میزان تخم‌گذاری و کاهش کیفیت تخم مرغ‌ها به شکل لمبه‌گذاری جلوه کرده است. قبلاً اثبات شده است که وجود ضایعات میکروسکوپی در ارگان‌های احشایی به دنبال واگیری بیماری مارک می‌تواند بر رشد و عملکرد و میزان تولید تخم اثر منفی داشته باشد (Foder et al., 2009).

در مطالعه حاضر به توزیع بافتی آنتی ژن A ویروس مارک در ارگان‌های مختلف نیز پرداخته شده است. به این منظور از ارگان‌های مختلف پرندگان مبتلا به بیماری مارک نمونه‌گیری انجام شد و ضمن بررسی نتایج PCR، از نظر میکروسکوپی نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد در تمامی نمونه‌هایی که از پرندگان آلوده به ویروس مارک اخذ شده است، ضایعات میکروسکوپی پرولیفراتیو دیده می‌شود که گاهاً

۷۰ درصدی ویروس مارک در ضایعات توموری در مرغ‌های خانگی نشان می‌دهد که اگرچه شیوع آلودگی با ویروس مارک در مرغ‌های خانگی با ضایعه توموری بالا است، اما عوامل دیگر تومورزا مانند ویروس لکوز و رتیکولاندوتلیوز نیز می‌توانند به شکل انفرادی و یا توأم با ویروس مارک در تومورزایی نقش داشته باشند که در مطالعه اخیر بررسی نشده‌اند. قبلاً داویدسون و برنزتین در سال ۱۹۹۹ بیماری مارک، لکوز و رتیکولاندوتلیوز را به عنوان سه بیماری توموری شایع در فارم‌های طیور معرفی کردند که علاوه بر بروز انفرادی، گاهی می‌توانند به صورت توأم در یک فارم نیز مشاهده شوند (Davidson and Borenstein, 1999).

در خصوص تشخیص بیماری مارک، بکر و همکاران در سال ۱۹۹۲ به طراحی دو زوج پرایمر پرداختند که با تکثیر قطعه ۳۱۴ جفت بازی مربوط به ژن کدکننده آنتی‌ژن ترشچی A به شناسایی ویروس عامل بیماری مارک و با تکثیر قطعه ۴۳۴ جفت بازی از قطعه تکرار شونده ۱۳۲ جفت بازی به وضعیت بیماری‌زایی ویروس ردیابی شده می‌پردازد (Becker et al., 1992). با توجه به گزارشات متعددی که بهترین راه تشخیص افتراقی سویه‌های بیماری‌زا از سویه‌های غیربیماری‌زای ویروس مارک را استفاده از پرایمرهای مذکور اعلام کرده‌اند (Becker et al., 1992; Balena et al., 2019; Kozum et al., 2001)، لذا در مطالعه حاضر هم به منظور شناسایی ویروس مارک در نمونه‌ها از جفت پرایمر طراحی شده جهت تکثیر قطعه ۳۱۴ جفت بازی مربوط به ژن کدکننده آنتی‌ژن ترشچی A و به‌منظور تعیین پاتوتیپ سویه‌های شناسایی شده از جفت پرایمر طراحی شده بر اساس تکثیر قطعه ۴۳۴ جفت بازی از

این جراحات به صورت ماکروسکوپی نبوده و فقط ارتشاح میکروسکوپی سلول‌های لنفوبلاستی دیده می‌شود. نتایج PCR مربوط به ارگان‌های نمونه‌گیری نیز نشان داد که در تمامی نمونه‌های بافتی با ضایعه ماکروسکوپی و یا میکروسکوپی تومور، ژن کدکننده آنتی ژن A ردیابی شد. لذا به نظر می‌رسد در مرحله تومورزایی صرف نظر از وجود یا عدم وجود ضایعات ماکروسکوپی توموری، ژن کدکننده آنتی ژن A قابل ردیابی است و از یک توزیع بافتی گسترده تبعیت می‌کند. اگرچه در مطالعه اخیر عمده نمونه‌برداری‌ها از تلفات بوده و نمونه خون دریافت نشده، اما مطالعات قبلی نشان داده است که در مرحله توموری معمولاً خون فاقد ژن‌های مربوط به ردیابی ویروس مارک است (Mohammadi *et al.*, 2005)، که علت آن‌را به ویرمی بسیار کوتاه مدت ویروس مارک نسبت داده‌اند. به-هرحال، بیماری‌زایی ویروس مارک و تکثیر ویروس در اکثر ارگان‌های احشایی و از طرفی ویرمی کوتاه مدت این ویروس در خون می‌تواند توجیه‌کننده این تفاوت باشد.

با توجه به وجود ۴ مرحله سیتولیتیک اولیه، عفونت مخفی، سیتولیتیک ثانویه و مرحله تومورزایی در روند بیماری‌زایی ویروس مارک (Schat *et al.*, 2013)، به نظر می‌رسد مرحله نمونه‌گیری در مطالعه اخیر مربوط به مرحله تومورزایی بوده است چرا که در این مرحله تجمعات لنفاوی به شکل ماکروسکوپی و میکروسکوپی در بافت‌های مبتلا جلوه نموده است.

مشاهده مقاطع هیستوپاتولوژی نشان داد که ضایعات میکروسکوپی عمدتاً به شکل التهاب و ارتشاح سلول‌های مونونوکلئار است که به نظر می‌رسد واکنش‌های التهابی به دلیل اثرگذاری کانون‌های تجمعی بر بافت‌های اطراف باشد. از طرفی با توجه به ردیابی ژن کدکننده آنتی ژن A در بافت‌های ضایعه‌دار و نیز بافت‌های به ظاهر سالم در پرندگان مبتلا می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که احتمالاً آنتی ژن A در مرحله تومورزایی به خوبی بیان می‌شود و این ژن صرف‌نظر از وجود ضایعه ماکروسکوپی یا میکروسکوپی در پرندگان مبتلا قابل ردیابی است. به‌رحال، برای تایید یا رد این فرضیه نیاز به مطالعات بیشتر در روند بروز این بیماری و ردیابی این ژن در مراحل مختلف بیماری مارک است.

به‌طورکلی، نتایج مطالعه اخیر نشان داد که بیماری مارک در ایجاد ضایعات توموری در ماکیان خانگی نقش عمده‌ای دارد و در پرندگان آلوده به ویروس مارک در مرحله تومورزایی، علاوه بر مشاهده ضایعات ماکروسکوپی تومور و ردیابی ژن کدکننده آنتی ژن A در آن ضایعات، این ژن در سایر ارگان‌های واجد ضایعه میکروسکوپی نیز قابل ردیابی است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

منابع

- Balena, V., Reddy, M.R., Singh, R., Kumar M., Palanivelu M., Karikalan M., *et al.* (2019). Identification of very virulent marek's disease virus strains in India by sequence analysis of 132 bp repeats of BamH-HI region. *Indian Journal of Animal Research*, (In press).
- Bancroft, J.D. and Stevens, A. (1996). *Theory and Practice of Histopathological Techniques*. UK: London, Churchill livingstone, pp: 100-110.
- Becker, Y., Asher, Y., Tobar, E., Davidson, I., Malkinson, M. and Weisman, Y. (1992). PCR for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek disease virus and vaccine viruses of MDV-serotype 2 and 3. *Journal of Virological Methods*, 40(3): 307-322.
- Boodhoo, N., Gurung, A., Sharif, S. and Behboudi, S. (2016). Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. *Veterinary Research*, 47(2): 119.
- Davidson, I. and Borenstein. R. (1999). Multiple infections of chickens and turkeys with avian oncogenic viruses: Prevalence and molecular analysis. *Acta Virologica*, 43: 136-142.
- Doosti, A. and Golshan, M. (2011). Molecular study for detection of Marek's disease virus (MDV) in southwest of Iran. *Scientific Research and Essays*, 6(12): 2560-2563.
- Fodor, I., Coman, M. and Catana, N. (2009). An outbreak of Marek's disease in broiler chickens: Epidemiological, clinical and anatopathological aspects. *Lucrari Stinitifice Medicina Veterinara*, 2(1): 224-227.
- Kalyani, I.H., Joshi, C.G., Jhala, M.K., Bhandari, B.B. and Purohit, J.H. (2011). Characterization of 132 bp repeats BamH1-H region in pathogenic Marek's disease virus of poultry in Gujarat, India, using PCR and sequencing. *Indian Journal of Virology*, 22: 72-75.
- Kozdrun, W., Samorek-Salamonowicz, E. and Czekay, H. (2001). PCR for the differentiation of Marek's disease virus strain. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 45(10): 5-10.
- López-Osorio, S., Piedrahita, D., Espinal-Restrepo, M.A., Ramírez-Nieto, G.C., Nair, V., Williams, S.M., *et al.* (2017). Molecular characterization of Marek's disease virus in a poultry layer farm from Colombia. *Poultry Science*, 96: 1598-1608.
- Mohammadi, A., Keyvanfar, H., Hemmatzadeh, F. and Bozorgmehri-Fard, M.H. (2005). Molecular detection of Marek disease virus (MDV) in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 60(2): 125-130.
- Schat, K.A. and Nair, V. (2013). Marek's Disease. In: *Disease of Poultry*. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, R., Nolan, L.K, Suarez, D.L. and Nair, V.L. editors. 13th ed., USA: W.B. Publishing, Massachusetts, pp: 517-548.
- Singh, S.D., Barathidasan, R., Kumar, A., Deb, R., Kumar-Verma, A. and Dhama, K. (2012). Recent Trends in Diagnosis and Control of Marek's Disease (MD) in Poultry. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(3): 964-970.

Molecular detection of Marek's virus in backyard fowl with nodular lesions in visceral organs

Gholami-Ahangaran, M.*¹, Moghtadaei-Khorasgani, E.², Ahmadi-Dastgerdi, A.³

1- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.

*Corresponding author's email: mgholamia1388@yahoo.com

(Received: 2018/1/29 Accepted: 2019/5/1)

Abstract

Marek's disease (MD) is one of the major immunosuppressive diseases in the poultry breeding industry, which can cause lymphoproliferative lesions in various visceral organs. Early identification of the disease in laying farms will prevent the cost of treatment and allows prompt decision-making on control measures and bio-security against the disease. In this respect, for detection of Marek's disease virus (MDV) in nodular lesions of visceral organs of backyard fowls and tissue tropism of MDV, 50 samples were collected from suspected cases of Marek's disease (MD). The samples were prepared from various tissues with and without gross nodular lesions. After DNA extraction from tissue samples, a 314-bp fragment with specific primers was amplified using PCR test to identify the infected cases and the tissue distribution of the antigen-A gene. In addition, 434 bp fragment of tandem repeat were also amplified by the use of a specific primer for the purpose of differentiation of pathogenic strains from non-pathogens. The results showed that in all cases infected with the MDV, in the tumorigenic stage, the gene that codes for antigen A can be detected in tissues with and without lesions. In addition, all positive samples belong to pathogenic strains. Therefore, in the tumorigenic stage of the MD, in spite of the presence or absence of macroscopic symptoms in the carcass of birds, the antigen-A gene of MDV can be detected in all tissues.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Backyard fowl, Marek's disease, Molecular detection, Nodular lesion.