

ردیابی مولکولی زیر گروه J ویروس لکوز پرندگان در گله‌های اردک استان مازندران

مجتبی خسروی^۱، علیرضا نوریان^۲، سعید سیفی^{۳*}

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل، آمل - ایران.

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل، آمل - ایران.

پذیرش: ۲ اسفندماه ۱۴۰۲

دریافت: ۱۱ بهمن‌ماه ۱۴۰۲

چکیده

ویروس لکوز پرندگان یک ویروس سرطانی مسری است که می‌تواند گونه‌های مختلف پرندگان را آلوده کند. این ویروس از نظر اقتصادی در صنعت طیور حایز اهمیت بالایی است. هدف از این مطالعه شناسایی مولکولی سویه‌های در گردش ویروس لکوز در مزارع پرورش اردک در استان مازندران بود. پرندگان تازه تلف شده کالبدگشایی شدند و نمونه‌هایی از بافت‌های توموری برای تشخیص مولکولی ویروس‌های تومورزای پرندگان با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرازی (PCR) پردازش شدند. در کالبدگشایی بزرگ شدن منتشر و گاه ندولار اندام‌های داخلی و خونریزی در زیرکپسول کبد و طحال مشاهده شد. هر سه گله مورد بررسی از نظر آلودگی به زیرگروه J ویروس لکوز مثبت بودند، درحالی‌که تمام نمونه‌ها از نظر درگیری با ویروس‌های رتیکولواندوتلیوز و مارک منفی بودند. از آنجا که بیماری لکوز یک تهدید جدی برای صنعت طیور محسوب می‌شود و در حال حاضر واکسن و دارویی نیز ندارد، لذا انجام پایش‌های دوره‌ای و بررسی سویه‌های در حال چرخش ویروس توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های نتوپلاستیک، لوکوز پرندگان، اردک، مازندران.

مقدمه

مزرعه آلوده می‌کنند و می‌توانند باعث بروز بالای تومورهای لوکوز لنفوئیدی شوند، در حالی‌که زیر گروه‌های C و D به ندرت گزارش شده‌اند. زیر گروه J به دلیل بیماری‌زایی و انتقال سریع آن، شایع‌ترین ویروس لوکوز پرندگان است که ماکیان را تحت تاثیر قرار می‌دهد، این زیر گروه اولین بار در اواخر دهه ۸۰ میلادی در جوجه‌های گوشتی انگلستان گزارش شد و پس از آن به سرعت گسترش یافت و خسارات اقتصادی زیادی به صنعت جهانی طیور وارد کرد (۱۶). ویروس لوکوز J در پرندگان مختلفی از جمله مرغ، تخمگذار، مرغ گوشتی، اردکها و حتی پرندگان وحشی گزارش شده است. عوامل مختلفی از جمله تیپ ویروس، دوز و راه ورود ویروس، سن پرنده، تیپ پرنده (گوشتی یا تخمگذار) در میزان واگیری و مرگ و میر ناشی از درگیری با این ویروس تعیین کننده هستند. این بیماری هم از طریق افقی و هم از راه عمودی منتقل می‌شود و در حال حاضر هیچ واکسن تجاری علیه

نتوپلاسم‌ها در پرندگان به دو دسته تقسیم می‌شوند: ۱- گروهی که عامل ویروسی دارند ۲- گروهی که عاملشان ناشناخته است. بیشتر نتوپلاسم‌های پرندگان عامل ویروسی دارند و سه بیماری مهم نتوپلاستیک پرندگان که از نظر اقتصادی حائز اهمیت هستند شامل: مارک، لوکوز/سارکوما و رتیکولواندوتلیوز می‌باشند (۱۱). ویروس لوکوز پرندگان (ALV) در خانواده رتروویروسها، تحت خانواده اورتوتروویروسها و جنس آلفارتروویروس قرار دارد. بر اساس دامنه میزبان‌ها، خصوصیات گلیکوپروتین انولوپ ویروس و الگوهای خنثی‌سازی متقابل، ویروس‌های لوکوز پرندگان به ۱۱ زیر گروه A-K تقسیم بندی می‌شوند. زیر گروه‌های A, B, C, D, K و J اگزونوس بوده در حالی‌که زیر گروه‌های E, F, G, H و I جزو ویروس‌های اندونوس لوکوز هستند (۱۲). زیر گروه‌های A و B ویروس‌های رایجی هستند که جوجه‌ها را در شرایط



تلف شده، جمع آوری شده و برای کالبدگشایی به آزمایشگاه منتقل شد. ضایعات تومور مانند از بافتهای کبد و طحال بصورت جداگانه گرفته شد و تا انجام آزمایشهای مولکولی در فریز ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. با توجه به اینکه تشخیص قطعی ویروس عامل ایجاد تومور از راه مشاهده ممکن نمیباشد، به همین دلیل ردیابی مولکولی با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی برای هر سه ویروس تومور زای لکوز، مارک و رتیکولاندوتلیوز انجام شد. برای ردیابی RNA ویروس‌های لکوز و رتیکولاندوتلیوز و DNA ویروس مارک از کیت استخراج Viral DNA/RNA شرکت اینترون (کره جنوبی)، استفاده شد. برای ویروس‌های لکوز و رتیکولاندوتلیوز آزمون سنتز cDNA توسط کیت تجاری Sinaclon First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت سیناکلون مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده با بهره‌گیری از پرایمر راندوم هگزامر انجام شد. مشخصات زوج آغازگرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ آمده است. واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس شرکت یکتا تجهیز (YTA PCR mastermix)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر بود. محصول نهایی واکنش در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

آن وجود ندارد. در نتیجه، تنها راه کاهش میزان درگیری با این بیماری، تشخیص سریع و حذف پرندگان است که ویروس را دفع می‌کنند (۲ و ۱۳). به دلیل شرایط آب و هوایی مناسب استان مازندران، پرورش اردک چه صورت بومی و چه به صورت نیمه صنعتی در این منطقه از کشور رونق دارد. در فصول پاییز و زمستان و زمانی که فعالیت کشاورزی در مزارع برنج صورت نمی‌گیرد، پرورش اردک در این زمین‌ها مرسوم است. به دلیل نزدیکی مزارع پرورش طیور با زمین‌های کشاورزی، در صورت آلودگی اردک‌ها، احتمال انتقال آلودگی به مزارع پرورش طیور نیز وجود دارد. به همین دلیل ردیابی ویروس عامل این بیماری حایز اهمیت است. بر اساس دانسته‌های ما تاکنون تحقیقی درخصوص شیوع بیماری لکوز J در گله‌های اردک در کشور صورت نگرفته است.

مواد و روش کار

نمونه‌ها از ۳ مزرعه پرورش نیمه صنعتی اردک در شهرهای آمل، بابل و فریدونکنار با جمعیت بین ۶۵۰-۴۵۰ قطعه اردک در هر مزرعه، جمع آوری شد. گله‌های مورد بررسی سابقه‌ای از مرگ و میر با کاهش تولید تخم داشتند و در کالبدگشایی ضایعات مشکوک تومور مانند در اندام‌های داخلی مشاهده شد. از هر مزرعه، پنج پرندۀ تازه

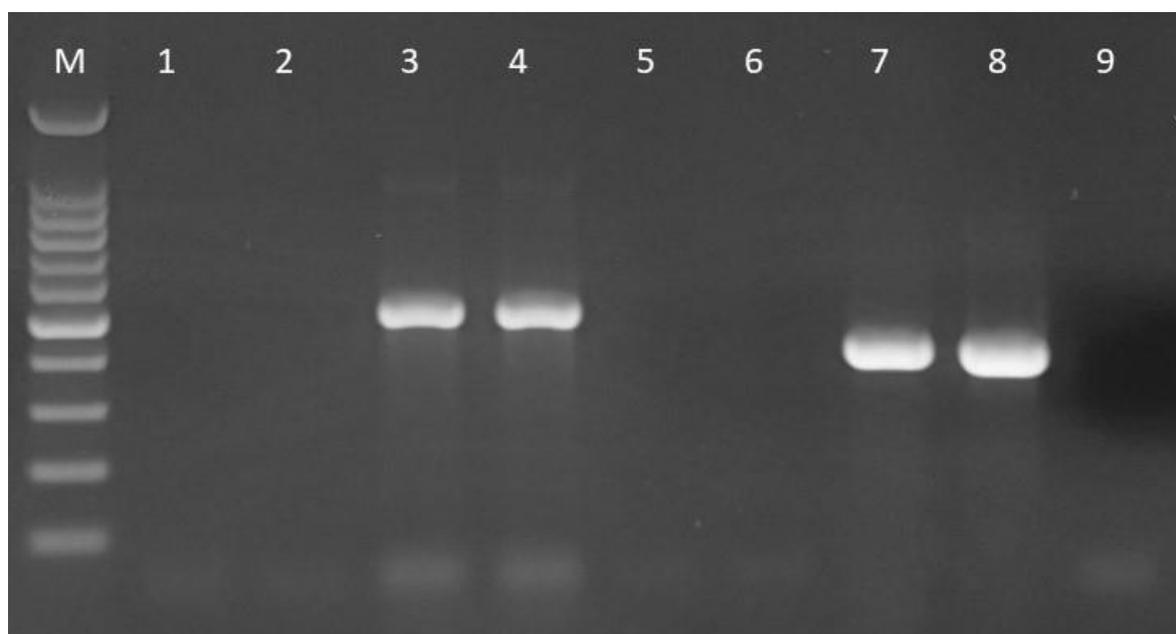
جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی

منبع	ژن هدف	ویروس مورد نظر	اندازه محصول (bp)	توالی (5' - 3')	آغازگر
(۱)	REV-LTR	رتیکولاندوتلیوز	۲۰۰	AATGGTTGTAAAGGGCAGAT CTCCTCTCACTGCCAATCT	SNV-LTR-F SNV-LTR-R
(۶)	Meq	مارک	۱۰۸۱	GGCACGGTACAGGTGTAAAGAG GCATAGACGATGTGCTGCTGAG	Meq F Meq R
(۱۴)	env	زیر گروه J لکوز	۵۴۵	GGATGAGGTGACTAAGAAAG CGAACCAAAGGTAACACACG	H5 H7
(۵)	env	زیر گروه A لکوز	۷۱۵	CGGAGAAGACACCCCTTGCT GCATTGCCACAGCGGTACTG	PF AR
		زیر گروه B لکوز	۵۱۵	GTAGACACCAGCCGGACTATC	BR
		زیر گروه J لکوز	۴۲۲	CGAACCAAAGGTAACACACG	JR

نتایج

در کالبدگشایی هیچ اثری از آلودگی باکتریایی پرنده‌ها مشاهده نشد. بیشترین ضایعات دیده شده در لاشه‌ها مربوط به بافت کبد بود. کبد بصورت منتشر بزرگ شده بود و در برخی لاشه‌ها کانون‌های توموری دیده می‌شد. خونریزی زیر کپسول کبد در اکثر لاشه‌ها مشاهده شد. همچنین طحال نیز به شدت بزرگ شده و پر خون بود. به منظور ردیابی مولکولی، آغازگرهای SNV-LTR-R و F به عنوان آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص ویروس رتیکولاندوتلیوز در نمونه‌های بافتی مورد استفاده قرار گرفتند. اما در هیچ کدام از نمونه‌ها، الگوی DNA قادر به تکثیر قطعه ای نبود. همچنین برای

ردیابی ویروس مارک از آغازگرهای اختصاصی Meq F و Meq R استفاده شد که همه نمونه‌های مورد مطالعه از نظر حضور این ویروس منفی بودند. ردیابی در مورد ویروس لکوز J با استفاده از دو زوج پرایمر که در هر دو ژن هدف *env* بود، انجام گرفت. ابتدا با آغازگرهای PF و JR حضور این ژن ردیابی شد و سپس با استفاده از آغازگرهای H5 و H7 مورد تایید قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که نمونه‌های گرفته شده از کبد و طحال پرندگان از ۳ گله مختلف اردک، از نظر حضور ویروس لکوز مثبت بودند و زیر گروه J لکوز در همه آنها شناسایی شد (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز. M: مارکر DNA (1000bp)، 1: زیر گروه A لکوز، 2: زیر گروه B لکوز، 3 و 4: زیر گروه J لکوز (بر اساس آغازگرهای Smith و همکاران، ۱۹۹۸)، 5: رتیکولاندوتلیوز، 6: مارک، 7 و 8: زیر گروه J لکوز (بر اساس آغازگرهای Gao و همکاران، ۲۰۱۳)، 9: کنترل منفی

بحث

بیشتر مطالعات مولکولی منتشر شده در مورد ALV بر روی ماکیان متمرکز بوده است. هر چند گزارش‌هایی بصورت تک گیر در سایر پرندگان هم وجود دارد (۷، ۴). در این مطالعه ردیابی مولکولی این ویروس در گله‌های اردک پرورشی در استان مازندران انجام شده است. برخی مطالعات گذشته بیان کردند که آلودگی با ویروس ALV

در گله‌های اردک تخمگذار و یا گوشتی به ندرت اتفاق می‌افتد ولی مطالعات اخیر نشان‌دهنده شیوع این بیماری در گله‌های اردک می‌باشد (۱۶، ۱۵). از آنجا که تفریق بین تومورهای مختلف در پرندگان تنها از راه مشاهده امکان پذیر نیست و از طرفی امکان عفونت همزمان با دو یا هر سه ویروس وجود دارد (۳ و ۱۷)، در مطالعه حاضر ردیابی مولکولی هر سه ویروس تومورزای پرندگان یعنی



و رتیکولاندوتلیوز را در دو قطعه طاووس سبز گزارش دادند.

در این مطالعه آلودگی اردکهای پرورشی در استان مازندران به لکوز J تایید شده است. مشخص نیست که این گله‌ها آلودگی را از پرندگان وحشی گرفته‌اند یا از پرندگان اهلی؟ همچنین در خصوص احتمال انتقال آلودگی از این پرندگان به گله‌های صنعتی طیور اطلاعاتی در دست نداریم. انجام مطالعات آتی درخصوص سیر تکاملی و اکولوژی ویروس لکوز J می‌تواند پاسخ این سوالات را بدهد.

قدردانی و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل انجام شد. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را بابت این حمایت اعلام می‌دارند.

منابع

1. Bao, K.Y; Zhang, Y.P; Zheng, H.W; Lv, H.C; Gao, Y.L; Wang, J.F; Gao, H.L; Qi, X.L; Cui, H.Y; Wang, Y.Q; Ren, X.G; Wang, X.M and Liu, C.J; Isolation and full-genome sequence of two reticuloendotheliosis virus strains from mixed infections with Marek's disease virus in China. *Virus Genes*; 2015; 50: 418-424.
2. Borodin, A.M; Emanuilova, Z.V; Smolov, S.V; Ogneva, O.A; Konovalova, N.V; Terentyeva, E.V; Serova, N.Y; Efimov, D.N; Fisinin, V.I; Greenberg, A.J and Alekseev, Y.I; Eradication of avian leukosis virus subgroups J and K in broiler cross chickens by selection against infected birds using multilocus PCR. *PloS one*; 2022; 17(6): e0269525.
3. Davidson, I and Borenshtein, R; The feather tips of commercial chickens are a favorable source of DNA for the amplification of Marek's disease virus and avian leukosis virus, subgroup J. *Avian Pathol*; 2002; 31(3): 237-240.
4. Freick, M; Schreiter, R; Weber, J; Vahlenkamp, T.W and Heenemann, K; Avian leukosis virus (ALV) is highly prevalent in fancy-chicken flocks in Saxony. *Arch Virol*; 2022; 167: 1169-1174.

مارک، رتیکولاندوتلیوز و لکوز انجام گرفت و بر اساس نتایج نمونه‌ها از نظر لکوز مثبت بودند. در مرحله بعدی ردیابی زیر گروه J لکوز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این زیر گروه انجام شد که در تمامی نمونه‌ها، لکوز J تایید شد. گرچه استفاده از روش میکروسکوپی (تهیه لام و بررسی زیر میکروسکوپ) در مطالعه تومورها مفید می باشد، اما قادر به تعیین عامل بیماری نیست، به همین دلیل از ردیابی مولکولی ویروس در نمونه های توموری استفاده شد.

همانگونه که بیان شد، پرورش اردک در فصول پاییز و زمستان که زمین‌های کشاورزی زیر کشت نیستند، رونق دارد. نتایج بیانگر وجود آلودگی در گله های اردک است و چون گله‌های اردک در هر سه شهرستان (آمل، بابل و فریدونکنار) این آلودگی را نشان دادند، می‌توان اظهار داشت که میزان شیوع بیماری در گله‌های اردک مادر که تامین کننده جوجه اردک یکروزه می‌باشند، بسیار بالاست. ویروس لکوز می‌تواند به صورت افقی و عمودی منتقل شود، اما انتقال عمودی از طریق تخم مرغ در شیوع لکوز نقش مهمتری دارد (۱۱). به دنبال انتقال عمودی، نتایج آلوده قادر به ایجاد پاسخ ایمنی و تولید آنتی بادی نیستند و در نتیجه باعث سرکوب سیستم ایمنی می‌شود (۱۰). با توجه به اینکه مشخص شده است که بین ژن‌های *env* ماکیان با اردکها و پرندگان وحشی همسانی وجود دارد، به حداقل رساندن تماس بین طیور اهلی و پرندگان وحشی به منظور کاهش بروز بیماری اهمیت ویژه ای دارد.

گزارش‌هایی از شیوع لکوز در بین اردکها، اردکهای وحشی و سایر پرندگان (غیر از ماکیان) در دنیا وجود دارد که با یافته های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارند. Soliman و همکاران (۱۵) ردیابی لکوز J را در اردکهای مادر در کشور مصر اعلام کردند و گزارش دادند از پنج گله مورد مطالعه، یک گله مبتلا به لکوز J بود. Kilany و همکاران (۸) از جداسازی ویروس لکوز J در گله‌های تجاری اردک پکنی در مصر خبر دادند که با افزایش تلفات، کاهش تخم‌گذاری و کاهش جوجه درآوری همراه بود. Zeng و همکاران (۱۶)، شیوع لکوز J را در اردکهای وحشی چین بیان کردند. Li و همکاران (۹) موفق به جداسازی ویروس لکوز از پرندگان وحشی در شمال شرق چین شدند. Khordadmehr و همکاران (۷) عفونت همزمان با لکوز



12. Payne, L and Nair, V; The long view: 40 years of avian leukosis research. *Avian Pathol*; 2012; 41 (1): 11-19.
13. Qin, L; Gao, Y; Ni, W; Sun, M; Wang, Y; Yin, C; Qi, X; Gao, H and Wang, X; Development and application of real-time PCR for detection of subgroup J avian leukosis virus. *J. Clin. Microbiol*; 2013; 51(1): 149-154.
14. Smith, L.M; Brown, S.R; Howes, K; McLeod, S; Arshad, S.S; Barron, G.S; Venugopal, K; McKay, J.C and Payne, L.N; Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus. *Virus Res*; 1998; 54(1): 87-98.
15. Soliman, Y.A; Gamal, M.A; El-Nagar, E.M; Khattab, M.S and Salem, H.M; Detection of avian leukosis virus subgroup J in Egyptian ducks and chicken using molecular and histopathological approach and allocation of genetic mutations and recombination events in the envelope protein gene gp85. *J. Adv. Vet. Res*; 2023; 13(2): 277-287.
16. Zeng, X; Liu, L; Hao, R and Han, C; Detection and molecular characterization of J subgroup avian leukosis virus in wild ducks in China. *PLoS One*; 2014; 9(4): e94980.
17. Zheng, L.P; Teng, M; Li, G.X; Zhang, W.K; Wang, W.D; Liu, J.L; Li, L.Y; Yao, Y; Nair, V and Luo, J; Current Epidemiology and co-Infections of avian immunosuppressive and neoplastic diseases in chicken flocks in central China. *Viruses*; 2022; 14(12): 2599.
5. Gao, Q; Yun, B; Wang, Q; Jiang, L; Zhu, H; Gao, Y; Qin, L; Wang, Y; Qi, X; Gao, H; Wang, X and Gao, Y; Development and application of a multiplex PCR method for rapid differential detection of subgroup A, B, and J avian leukosis viruses. *J. Clin. Microbiol*; 2014; 52(1): 37-44.
6. Gong, Z; Zhang, L; Wang, J; Chen, L; Shan, H; Wang, Z and Ma, H; Isolation and analysis of a very virulent Marek's disease virus strain in China. *Viol. J*; 2013; 10:155.
7. Khordadmehr, M; Firouzmandi, M; Zehtab-Najafi, M and Shahbazi, R; Naturally occurring co-infection of avian leukosis virus (Subgroups A-E) and reticuloendotheliosis virus in green peafowls (*Pavo muticus*). *Braz. J. Poult. Sci*; 2017; 19(4): 609-614.
8. Kilany, W.H; Soliman, M.A; Safwat, M; Mehana, O; El-Magid, M.A; Marwa, A.E; Hassan, M.K and Nasif, S.A; Detection of avian leukosis virus subgroup J from commercial Peking duck breeder farm in Egypt. *Int. J. Virol*; 2015; 11: 139-145.
9. Li, D; Qin, L; Gao, H; Yang, B; Liu, W; Qi, X; Wang, Y; Zeng, X; Liu, S; Wang, X and Gao, Y; Avian leukosis virus subgroup A and B infection in wild birds of Northeast China. *Vet. Microbiol*; 2013; 163(3-4): 257-263.
10. Li, J.L and Cui, Y.S; Progress on subgroup J avian leucosis virus for the past few years. *Prog. Vet. Med*; 2010; 31: 199-201.
11. Nair, V. Neoplastic disease. In: Swayne, D.E; Logue, C.M; McDougald, L.R; Nair, V and Suarez, D.L; *Diseases of poultry*; 14th. Ed.; New York: John Wiley & Sons, 2020; pp: 548-550.





Evaluation of the Effects of Vitamin E (α -Tocopherol) Supplementation in the extender containing egg yolk on the Characteristics of Canine Cryopreserved Semen

Mojtaba Khosravi¹; Alireza Nourian²; Saied Seifi³

- 1- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol- Iran.
- 2- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.
- 3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol- Iran.

Accepted: 21 February 2024 *Received:* 31 January 2024

Summary

Avian leukosis virus is a contagious oncogenic virus that can infect various bird species. This virus is economically important in the poultry industry. The aim of this study was to identify molecular strains of leukosis virus circulating in duck farms in Mazandaran province. Freshly dead birds were necropsied and samples of tumor tissues were processed for molecular detection of avian tumorigenic viruses using polymerase chain reaction (PCR). At necropsy, diffuse and sometimes nodular enlargement of the internal organs and subscapular hemorrhage in the liver and spleen was noted. All three studied flocks were positive for infection with serogroup J of leukosis virus, while all samples were negative for involvement with reticuloendotheliosis and Marek's disease viruses. Since leukosis is a serious threat to the poultry industry and currently does not have a vaccine or medicine, it is recommended to carry out periodic monitoring and analysis for the circulating strains of virus.

Keywords: Neoplastic diseases, Avian leukosis, Duck, Mazandaran.

*Corresponding author: s.seifi@ausmt.ac.ir

