مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۱، ۱۴-۷

مطالعه مولکولی آلودگی به ویروس لکوز تحت گروه J در گله‌های اجداد گوشتی در ایران

ذوالفقار رجبی محمد حسن بزرگمهری فرد* سید مصطفی پیغمبری

گرو علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۶ تیر ماه ۱۳۸۶ ، پذیرش نهایی: ۲۱ اسفند ماه ۱۳۸۶)

چکیده

ویروس تحت‌گروه J لکوز پرندگان (ALV-J) در اواخر دهه ۱۹۸۰ در انگلیس در جوجه‌های گوشتی جدا شد. ویروسهای تحت‌گروه J به استثناء واریانت‌های حاد معمولا با دوره کمون طولانی باعث ایجاد لکوز میلوئید در جوجه‌های مادر گوشتی می‌شوند. در این مطالعه ضمن ارزیابی پرایمرهای مختلف و بعضی از روشهای تشخیص مولکولی، وضعیت ویروس تحت‌گروه J لکوز پرندگان در شش آمیخته اجداد گوشتی در ایران بررسی شدند. برای این منظور از هرآمیخته گوشتی ۱۰۰ نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد، ۱۰۰ نمونه مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما و ۱۰۰ نمونه پالپ پر بصورت کاملا تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها با روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور کاهش تعداد نمونه‌های مورد آزمایش در هرآمیخته، نمونه‌ها قبل از استخراج DNA با هم مخلوط می‌شدند. مطالعه مولکولی به روش PCR و nested-PCR با پرایمرهای مختلف، روی مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و پالپ پر انجام گرفت. در روش PCR نمونه مثبتی جدا نشد ولی در روش nested-PCR از شش آمیخته گوشتی، پنج آمیخته به پروویروس تحت‌گروه J آلوده بودند. براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق اکثر آمیخته‌های اجداد گوشتی موجود در ایران به ویروس تحت‌گروه J لکوز پرندگان آلوده است. همچنین مشخص شد با مخلوط کردن نمونه‌ها و استفاده از روش مولکولی حساس تر (nested-PCR) انجام مطالعه فارمی ویروس تحت‌گروه J لکوز پرندگان تسهیل می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اجداد گوشتی، ویروس تحت گروه J، روش مولکولی.

مقدمه

رتروویروسهای پرندگان که به عنوان ویروسهای لکوز پرندگان شناخته می‌شود (ALVs) عامل بیماریهای گروه لکوز/سارکوما در پرندگان می‌باشند. بیماریهای گروه لکوز/سارکوما تنوعی از نئوپلاسمهای قابل انتقال خوش خیم و بد خیم از جمله، لکوزها، تومورهای بافت همبند، تومورهای اپی تلیال و تومورهای اندوتلیال در ماکیان هستند. لکوزها خود شامل لکوز لنفوئید، اریتروبلاستوز، میلوبلاستوز و میلوسیتوما می‌باشند. در حال حاضر شایع ترین بیماریهای گروه لکوز / سارکوما در گله‌ها، لکوز لنفوئید است که اخیرا لکوز میلوئید نیز در بین گله‌های مادر گوشتی شیوع یافته است. گسترش بیماری لکوز از لحاظ اقتصادی اهمیت زیادی دارد. خسارات اقتصادی، ناشی از افزایش تلفات (۲-۱ درصد که گاهی به بیش از ۲۰ درصد می‌رسد)، کاهش تولید و هزینه ریشه کنی بیماری است، که تخمین زده می‌شود میلیونها دلار در سال باشد. کنترل بیماری با واکسنها بدلایلی از جمله تحمل پادگنی موفقیت آمیز نبوده است. انجام برنامه‌های ریشه کنی در سطح گله‌های مادر گرچه موجب کاهش بروز بیماریهای نئوپلاستیک ناشی از ALVs در صنعت طیور طی ۳۰ سال گذشته شده و تغییرات در جمعیت ALVs در این دوره به حداقل کاهش یافته است، ولی در اواخر دهه ۱۹۸۰ در انگلستان تحت گروه جدید ALV، تحت گروه J ویروس لکوز پرندگان (ALV-J) ظاهر و به سرعت در صنعت طیور جهان انتشار یافت. این ویروس حاصل نوترکیبی ویروسهای اگزوژن و آندوژن است. تغییرات آنتی ژنیک ناشی از نوترکیبی و جهش های نقطه‌ای باعث تولید واریانت‌های متعدد شده است که بعضی از آنها باعث ترانسفورماسیون حاد می‌شوند. ویروسهای تحت گروه J بر خلاف سایر تحت گروههای لکوز پرندگان، در انتقال افقی در هفته‌های اول معمولا تحمل پادگنی ایجاد می‌کند. به همین دلیل کنترل و ریشه کنی بیماری و عفونت ناشی از آن مشکل می‌باشد. ویروسهای تحت گروه J به استثنائ واریانت‌های حاد، بدلیل نداشتن انکوژن ویروسی درژنوم، معمولا با دوره کمون طولانی باعث ایجاد لکوز میلوئید در جوجه‌های مادر گوشتی می‌شوند. در حال حاضر بیماری ناشی از ALV-J (لکوز میلوئید) در گله‌های گوشتی شیوع دارد و موجب خسارات اقتصادی سنگین می‌شود. ظهور سویه‌های جدید ALV موجب ایجاد بیماریهای جدید در صنعت طیور می‌شود. بنابراین تداوم مراقبت و پیشرفت در روشهای تشخیصی و درک بهتر مکانیسم بیماریزایی ALV برای کاهش خسارات حاصل از ویروسهای جدید ضروری است (۴،۵،۷،۱۲،۱۵).

روشهای متعددی برای شناسایی ویروسهای لکوز پرندگان وجود دارد ولی اغلب آنها نیاز به سلولهای با فنوتیپ مشخص دارند و زمانبر می‌باشند. محققان در تلاش هستند تا روشهای تشخیصی مناسبتری ابداع کنند (۱۰).

با توجه به اهمیت این بیماری و از آنجا که هنوز هیچ گزارشی در مورد این بیماری از ایران منتشر نشده است و بدلیل اینکه مطالعات انجام گرفته در جهان با روشهای مولکولی عمدتا محدود به مطالعات تجربی بوده و در سطح فارم انجام نگرفته بود این مطالعه با هدف ۱) بررسی وضعیت تحت گروه J لکوز پرندگان در گله‌های اجداد گوشتی ایران با استفاده از روش‌های PCR و nested-PCR، و ۲) انتخاب پرایمر مناسب و ارزیابی بعضی از روشهای تشخیصی موجود در سطح فارم انجام گرفت.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: mhbfard@ut.ac.ir

مواد و روش کار

گله‌های اجداد گوشتی: با توجه به اینکه هدف از این مطالعه، بررسی عفونت گله‌های اجداد گوشتی در ایران بود، از تمام آمیخته‌های اجداد گوشتی موجود در ایران نمونه جمع آوری گردید. تعداد آمیخته‌های گوشتی مورد مطالعه شش آمیخته بود که برای نامگذاری آنها از حروف بزرگ انگلیسی استفاده گردید. گله‌های مورد مطالعه در گروه سنی ۵۹-۸ هفتگی قرار داشتند. گله A در سن ۸ هفتگی، گله B در سن ۱۲ هفتگی، گله C در سن ۴۸ هفتگی، گله D در سن ۵۹ هفتگی، گله E در سن ۳۵ هفتگی و گله F در سن ۳۷ هفتگی نمونه برداری شدند. نمونه‌ها به صورت کاملا تصادفی جمع آوری شد. در این مطالعه نمونه‌ها به روش PCR و nested-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه‌های مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما: از یک فارم از هر آمیخته گوشتی، ۱۰۰ نمونه خون همراه با ماده ضد انعقاد اخذ شد. به این ترتیب که توسط سرنگ‌های دو میلی لیتر (ml) از ورید بالی آنها به حجم سرنگ خون اخذ شد، سپس به داخل لوله‌های آزمایش درب دار استریل که شماره‌گذاری شده و محتوی ماده ضد انعقاد بود (EDTA)، منتقل شد؛ غلظت EDTA یک میلی گرم در میلی لیتر خون 1mg/ml () بود. سپس لوله‌ها در دمای یخچال به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها با دور چهار هزار به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. سلولهای سفید خون همراه با پلاسما به میکروتیوبها مربوطه منتقل و روی آن شماره نمونه و تاریخ اخذ نمونه یاداشت و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

نمونه‌های مخلوط پلاسما، بافی کوت و سلولهای قرمز خون (خون): بعد از سانتریفوژ هر کدام از نمونه‌های خون و خارج کردن قسمت اعظم پلاسما، با پیپت مخلوطی از پلاسما، بافی کوت و خون به میکروتیوب دیگری منتقل و بعد از شماره‌گذاری (مطابق با شماره نمونه مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما) و یاداشت تاریخ اخذ نمونه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

نمونه‌های پالپ پر: بدنبال اخذ نمونه خون از هر قطعه مرغ جهت تهیه نمونه‌های پالپ پر اقدام گردید. سه پر از قسمتهای مختلف بدن که واجد پالپ پر بود جدا و قسمت حاوی پالپ پربین درب میکروتیوب و بدنه آن قرار داده شد و در دمای یخچال به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه، میکروتیوب‌های حاوی پالپ پر توسط اولترا سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفوژ شد، بعد از سانتریفوژ و خروج پالپ پر از بدنه پر، بدنه آن از میکروتیوب خارج و نمونه‌های پالپ پر که همه آنها مطابق با شماره نمونه خون و مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما شماره‌گذاری شده و تاریخ اخذ نمونه روی آنها نوشته شده بود تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

استخراج DNA: به منظور مطالعه رتروویروسها از جمله ویروس لکوز تحت گروه J می‌توان ژنوم ویروس (RNA) را بصورت مستقیم جستجو و شناسایی کرد و یا با توجه به مکانیسم تکثیر ویروس در سلول میزبان، ویروس رابصورت غیر مستقیم از طریق جستجوی پرووِیروس در ژنوم میزبان شناسایی کرد. در این مطالعه هدف جستجوی پرووِیروس بود که برای این منظور لازم است ابتدا ژنوم سلول میزبان را که احتمالا پرووِیروس به آن الحاق یافته از سلول خارج شود. نمونه‌های که برای استخراج استفاده شد شامل مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، مخلوط پلاسما بافی کوت و سلولهای قرمز خون و پالپ پر بود. برای استخراج DNA کیت High Pure PCR Template Preparation(Roche) بکار گرفته شد.

استخراج DNA از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما و مخلوط پلاسما، بافی کوت و سلولهای قرمز خون(خون): از آنجا که هدف، مطالعه آلودگی و عفونت گله به ویروس لکوز J بود و نه مطالعه انفرادی مرغها، لذا به جهت بهره برداری مناسب از بودجه طرح و ارزیابی حساسیت تکنیکهای PCR و nested PCR و تعیین تکنیک مناسب برای مطالعه فارمی ویروس تحت گروه J، نمونه‌های مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما (۴۰ نمونه) و مخلوط پلاسما، بافی کوت و سلولهای قرمز خون در هر آمیخته گوشتی هر کدام به طور جداگانه با هم مخلوط شدند (۴۰ نمونه)، برای این منظور هر ۱۰ نمونه مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما یا ۱۰ نمونه خون از هر آمیخته گوشتی با هم مخلوط شدند به طوریکه در نهایت تعداد نمونه‌ها از هر نوع نمونه به ۴ عدد کاهش یافت. به منظور استخراج DNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت ابتدا به ۲۰۰µl از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما یا مخلوط پلاسما، بافی کوت و سلولهای قرمز خون، ۲۰۰µl بافر اتصال دهنده و ۴۰µl پرتئیناز K اضافه و سریعا مخلوط شد، سپس در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه گرماگذاری شد. بعد از ده دقیقه به آن ۱۰۰µl ایزوپروپانل اضافه و به خوبی مخلوط شد. با پیپت نمونه داخل لوله فیلترداری که داخل لوله جمع کننده بود گذاشته شد. بعد به مدت یک دقیقه با اولتراسانتریفوژ (Biotech international, B. Braun, AR15 Centrifuge) با دور ۸۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. لوله جمع کننده و مایع موجود داخل آن را کنار گذاشته و لوله فیلتردار داخل یک لوله جمع کننده جدید قرار داده شد. به داخل لوله فیلتردار ۵۰۰µl بافر حذف کننده مهارکننده اضافه و مجددا به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ لوله جمع کننده و مایع داخل آن کنار گذاشته و لوله فیلتردار داخل لوله جدید جمع کننده قرار داده شد و به آن ۵۰۰µl بافر شستشو اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید. برای تکمیل شستشو، لوله جمع کننده و مایع داخل آن کنار گذاشته شد و لوله فیلتردار داخل لوله جدید جمع کننده قرار گرفت و مجددا ۵۰۰µl بافر شستشو به لوله فیلتردار اضافه و سپس به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ مایع موجود داخل لوله جمع کننده دور ریخته شد و مجددا لوله فیلتردار داخل همین لوله قرار داده شد و ده ثانیه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. لوله جمع کننده همراه با مایع داخل آن کنار گذاشته شد و لوله فیلتردار داخل یک لوله ۱/۵ml استریل گذاشته شد

و به آن ۲۰۰µl بافر Elution که قبل از استفاده دمای آن به ۷۰ درجه سانتیگراد رسانده شده بود اضافه گردید و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ کمیت DNA موجود در مایع با بیوفتومتر (Biophotometer,Eppendorf) مشخص (3-20 ng/µl) و نمونه‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

استخراج DNA از پالپ پر: روش استخراج DNA از پالپ پر مطابق با دستورالعمل توصیه شده شرکت سازنده کیت استخراج DNA بود. لازم به ذکر است، نمونه‌های پالپ پر (۱۰۰ نمونه) نیز همانند نمونه‌های قبلی با هم مخلوط شدند به طوریکه در نهایت تعداد کل نمونه‌های پالپ پر در هر آمیخته به ۸ نمونه کاهش یافت. طبق دستورالعمل ابتدا از هر نمونه ۵۰ میلی گرم (mg) وزن شد، به آن ۲۰۰µl بافر لیز کننده بافت و ۴۰µl پروتئیناز K اضافه شد. بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۲-۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد به طوری که بافت به طور کامل هضم شده بود. سپس ۲۰۰µl بافر اتصال دهنده اضافه شد و بعد از مخلوط کردن به مدت ده دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. بعد از گرماگذاری ۱۰۰µl ایزوپروپانل اضافه شد. بعد از مخلوط کردن با پیپت بافتهای هضم نشده از محلول جدا و دور ریخته شد. محلول باقیمانده با پیپت به لوله فیلترداری که داخل لوله جمع کننده بود انتقال داده شد. سپس به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید. لوله جمع کننده محتوی مایع، از لوله فیلتردار جدا و کنار گذاشته شد. مجددا لوله فیلتردار داخل لوله جمع کننده قرار گرفت. به آن ۵۰۰µl بافر حذف مهار کننده اضافه شد و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. لوله جمع کننده محتوی مایع، کنار گذاشته شد و لوله فیلتردار داخل لوله جدید جمع کننده قرار داده شد. در ادامه ۵۰۰µl بافر شستشو اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ مجددا لوله جمع کننده حاوی مایع از لوله فیلتردار جدا و کنار گذاشته شد. لوله فیلتردار داخل لوله جدید جمع کننده قرار گرفت، سپس یکبار دیگر ۵۰۰µl بافر شستشو به لوله فیلتردار اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع موجود در لوله جمع کننده را دور ریخته و لوله فیلتردار مجددا داخل آن قرار داده شد، سپس به مدت ده ثانیه با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد تا همه مایع موجود در فیلتر خارج شود. بعد از سانتریفوز لوله فیلتردار داخل لوله ۱/۵ml قرار داده شد و بعد ۲۰۰µl بافر Elution که قبل از استفاده دمای آن به ۷۰ درجه سانتیگراد رسانده شده بود به داخل لوله فیلتردار اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع حاصل حاوی DNA بود که کمیت آن در دستگاه بیوفتومتر مشخص (3-20 ng/µl) و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

واکنش PCR با آغازگرهای Baf و Bar: این جفت آغازگر، ژن β-actin با وزن مولکولی ۴۰۱ جفت باز (bp) را در DNA ژنومیک جوجه شناسایی می‌کند و بدین ترتیب حضور DNA جوجه و امکان تکثیر قسمتی از آن را در نمونه‌های استخراجی مشخص می‌کند. آغازگر Baf بصورت مستقیم و آغازگر Bar بصورت معکوس عمل می‌کند. واکنش در حجم ۲۵µl انجام شد. غلظت و نوع مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل، ۲/۵µl از بافر 10xPCR واجد Mg (۱/۵mM)، ۱µl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5 mM)، ۱µl از آغازگر Baf و ۱µl از آغازگر Bar هر کدام با غلظت ۲۰ میکرومولار (20µM)، ۰/۵ واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/µl) (Roche) و ۵µl از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۲۵µl رسانده می‌شد. از نظر شرایط دمایی و تعداد سیکل (۱۱،۱۲)، ابتدا ۴ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، سپس ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد در مرحله دژنراسیون ۳۰، ثانیه دمای ۵۸ درجه سانتیگراد در مرحله اتصال، ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در مرحله تکثیر که در هر سیکل ۵ ثانیه با آن اضافه می‌شد. سه مرحله مذکور در ۳۵ سیکل انجام شد. به دنبال آن ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به عنوان دمای تکثیر نهایی برنامه ریزی شد. لازم به ذکر است برای واکنش PCR از دستگاه ترمال سایکلر گرادیانت اپندورف استفاده شد.

واکنش PCR با آغازگرهای H5 و H7b: آغازگر Smith H5 و همکاران درسال ۱۹۹۸ و Bagust H7b و همکاران درسال ۲۰۰۴ مشابه دو آغازگر قبلی برای تکثیر قسمتی از ویروس لکوز پرندگان و ویروس تحت گروه J طراحی شده است. وزن مولکولی محصول PCR bp ۵۴۴ است. آغازگر H5 بصورت مستقیم و آغازگر H7b بصورت معکوس عمل می‌کند. واکنش در حجم ۲۵µl انجام شد. غلظت و نوع مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل، ۲/۵µl از بافر 10xPCR واجد Mg (۱/۵mM)، ۱µl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5 mM)، ۱µl از آغازگر H5 و ۱µl از آغازگر H7b هر کدام با غلظت ۲۰ میکرومولار (20µM)، ۰/۵ واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/µl) (Roche) و ۵µl از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۲۵µl رسانده می‌شد. از نظر شرایط دمایی و تعداد سیکل Smith و همکاران درسال ۱۹۹۸ مشابه با واکنش PCR با آغازگرهای Baf و Bar بود.

واکنش PCR با آغازگرهای J5´ و J3´: این جفت آغازگر (Zavala و همکاران درسال ۲۰۰۲) قادر به تکثیر تمام توالی‌های ژنوم بیان کننده پروتئین‌های غشائ ویروس ALV-J است. وزن مولکولی محصول PCR، ۲۱۲۵bp است. آغازگر J5´ بصورت مستقیم و آغازگر J3´ بصورت معکوس عمل می‌کند. واکنش در حجم ۲۵µl انجام شد. غلظت و نوع مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل، ۲/۵µl از بافر 10xPCR واجد Mg (۱/۵mM)، ۱/۲۵µl از کلرید منیزیم با غلظت ۰/۰۱ مولار (MgCl2,0.01M)، ۱/۵µl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5 mM)، ۱µl از آغازگر Baf و ۱µl از آغازگر Bar هر کدام با غلظت ۲۰ میکرومولار (20µM)، ۰/۷۵ واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/µl) (Roche) و ۱۵µl از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۲۵µl رسانده می‌شد. از نظر شرایط دمایی و تعداد سیکل (Smith و همکاران درسال ۱۹۹۸) مشابه با واکنش PCR با آغازگرهای

Baf و Bar بود.

واکنش PCR با آغازگرهای H5 و H7: این جفت آغازگر (Smith و همکاران درسال ۱۹۹۸) برای تکثیر قسمتی از ویروس لکوز پرندگان طراحی شده است. آغازگر H5 به ناحیه بالادست از ´3 ژن pol متصل و قادر به شناسایی تحت گروههای مختلف ویروس لکوز پرندگان(ALV) است. آغازگر H7 به طور اختصاصی به ناحیه ´5 گلیکوپروتئین 85غشایی(gp85) ویروس ALV-J متصل و همراه با H5 قطعه‌ای با وزن مولکولی 545bp را تکثیر می‌کند. آغازگر H5بصورت مستقیم و آغازگر H7 بصورت معکوس عمل می‌کند. واکنش در حجم ۲۵µl انجام شد. غلظت و نوع مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل، ۲/۵µl از بافر 10xPCR واجد Mg(۱/۵mM)به علاوه ۱/۲۵۰۱ از mgcl2 با غلظت ۰۱/۰M، ۱µl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5 mM)، ۱µl از آغازگر H5 و ۱µl از آغازگر H7 با غلظت ۲۰ میکرومولار (20µM)، ۰/۵µl. فورمامید، ۰/۵. واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/µl)(Roche) و ۵µl از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۲۵µl رسانده می‌شد. از نظر شرایط دمایی و تعداد سیکل Smith و همکاران درسال ۱۹۹۸، به ترتیب، ۶۰ ثانیه دمای ۹۳ درجه سانتیگراد در مرحله دژنراسیون، ۶۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در مرحله اتصال، در هر سیکل یک درجه از دمای آن کاسته می‌شد، ۱/۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در مرحله تکثیر. بعد از ۱۳ سیکل واکنش در شرایط دمایی فوق، ۳۰ سیکل در شرایط دمایی زیر واکنش انجام شد. مرحله دژنراسیون در دمای ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۴۸ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ دقیقه، به دنبال آن ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به عنوان دمای تکثیر نهایی برنامه ریزی شد.

واکنش PCR با آغازگرهای نستد(nested) Leu3.2، Leu7R(جفت آغازگر خارجی) و Leu11F، Leu12R(جفت آغازگر داخلی): این آغازگرها قسمتی از U3 و U5 ناحیه LTR ویروسهای اگزوژن لکوز پرندگان را تکثیر می‌کنند.وزن مولکولی محصول PCR در مورد تحت گروههای A، C و J تقریبا ۲۱۰bp و در مورد تحت گروه D، ۱۷۵bp و در مورد تحت گروه B، حدود ۲۲۰bp است. آغازگر خارجی Leu3.2 و آغازگر داخلی Leu11F بصورت مستقیم و آغازگر خارجی Leu7R و آغازگر داخلی Leu12R بصورت معکوس عمل می‌کند(۶). برای کاهش آلودگی واکنش PCR نستد در یک میکروتیوب انجام گرفت. واکنش اول در حجم ۱۰µl انجام شد. غلظت و نوع مواد متشکل در این حجم شامل، ۱µl از بافر 10xPCR واجد Mg (۱/۵mM)، ۰/۵µl. کلرید منیزیم ۰۱/۰. مولار، ۱µl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۱ میلی مولار (1 mM)، ۱µl از آغازگر Leu3.2 و ۱µl از آغازگر Leu7R، هر کدام با غلظت ۰/۵. میکرومولار (0.5µM)، ۰/۵. واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/µl) (Roche) و ۱۵µl از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۱۰µl رسانده شد. حجم دومین واکنش ۴۰µl بود. ۳µl از بافر 10xPCR واجد Mg(۱/۵mM)، ۱/۵µl کلرید منیزیم ۰۱/۰. مولار، ۱/۲µl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5mM)، ۱/۲µl از آغازگر Leu11F و ۱/۲µl از آغازگر Leu12R، هر کدام با غلظت ۲۰ میکرومولار (20µM)، ۰/۵. واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/µl) (Roche) و ۱۰µl از محصول PCR حاصل از واکنش اول. حجم با آب مقطر استریل به ۴۰µl رسانده شد. واکنش اول و دوم از لحاظ شرایط دمایی یکسان بودند ولی از نظر تعداد سیکل با هم تفاوت داشتند. واکنش اول در ۱۵ سیکل انجام شد در حالی که واکنش دوم در ۳۵ سیکل انجام گرفت. مرحله دژنراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

بعد از اتمام واکنش اول میکروتیوبها از ترمال سایکلر خارج شد و به هر کدام ۳۰µl از محلولی که بغیر از آغازگرهای خارجی حاوی ترکیبات واکنش اول به علاوه آغازگرهای داخلی بود اضافه گردید و مجددا برای انجام واکنش دوم داخل ترمال سایکلر گذاشته شد.

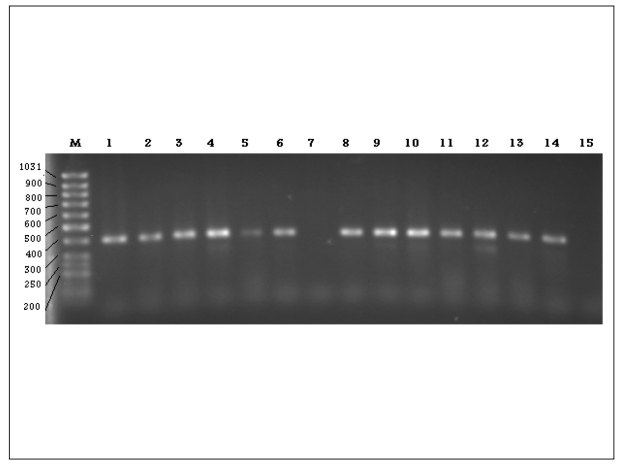
همه واکنشهای PCR در کنار کنترل مثبت(بغیر از واکنش PCR با آغازگرهای Baf و Bar) و منفی انجام گرفت. کنترل مثبت پلاسمید نوترکیب حامل ژنوم کامل ویروس لکوز J، سویه HPRS-103 بود(کنترل مثبت بنا به تقاضا توسط دکتر Venugopal از موسسه Health ,Compton Laboratory Animal در انگلستان ارسال شده بود). در کنترل منفی به جای محلول محتوی DNA مورد آزمایش آب مقطر اضافه شد.

در کلیه واکنشهای PCR، بعد از اتمام واکنش محصول PCR یا مستقیما الکتروفورز شد و یا تا زمان الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه یا دمای یخچال نگهداری گردید.

الکتروفورز: ارزیابی و جستجوی DNA تکثیر شده در واکنش PCR، به کمک روش الکتروفورز و طبق دستورالعمل کتاب molecular cloning انجام گرفت. سپس باند روی ترانس الیمیناتور مورد بررسی قرار گرفت و از آن عکسبرداری شد.

Restriction fragment long polymorphism(RFLP): با توجه به آنکه در برنامه نستد PCR، آغازگرهای مورد استفاده اختصاصی ALV-J نبوده و همه ویروسهای اگزوژن لکوز پرندگان را شناسایی می‌نماید. لذا برای تفریق تحت گروهها، بخصوص تحت گروههای A,C,J از همدیگر استفاده از آنزیم‌های محدود کننده، TaqI و DdeI(Roche) برای تفریق تحت گروههای مذکور ضروری بود. آنزیم DdeI، محصول PCR ویروس لکوز J را به دو قطعه 120bp و 90bp تقسیم می‌کند، در حالی که تحت گروههای دیگر بدون هضم می‌مانند. آنزیم TaqI محصول PCR تحت گروههای A و C را به دو قطعه 135bp و 65bp تقسیم می‌کند و روی تحت گروه J تاثیری ندارد.

محصول PCR نمونه‌های که بعد از الکتروفورز واجد باند 210bp بودند تحت تاثیر آنزیمهای محدود کننده قرار گرفت. روش کار به این نحو بود که



تصویر۱- واکنش PCR نمونه DNAهای استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و پالپ پر (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15) با استفاده از آغازگر Baf و Bar. M؛ DNA مارکر 50bp (Fermentas).

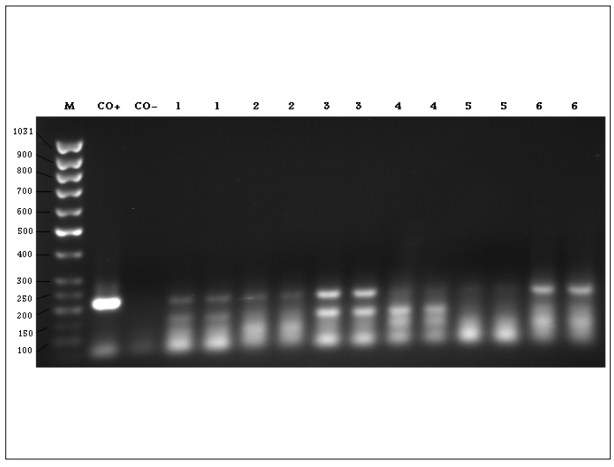
ابتدا کمیت DNA نمونه‌های مثبت با بیوفتومتر مشخص شد. هر نمونه محصول PCR براساس غلظت DNA در دو لوله به دو قسمت تقسیم شدند. سپس براساس دستورالعمل شرکت سازنده آنزیمهای محدودکننده، به یکی آنزیم TaqI و به دیگری آنزیم DdeI اضافه شد. دستورالعمل به این نحوبود که به ازاء هر ۱ میکروگرم DNA، در مورد آنزیم TaqI، ۲/۵ میکرولیتر بافر B و یک واحد آنزیم TaqI به نمونه اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۲-۱/۵ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. در مورد آنزیم DdeI، ۲/۵ میکرولیتر بافر H و یک واحد آنزیم DdeI به نمونه اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۲-۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد.

الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید: الکتروفورز: ارزیابی و جستجوی DNA تکثیر شده در واکنش PCR، به کمک روش الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره، طبق دستورالعمل کتاب cloning molecular انجام گرفت. سپس باند روی ترانس الیمیناتور سفید مورد بررسی قرار گرفت و از آن عکسبرداری شد(۸).

نتایج

واکنش PCR با جفت آغازگر Baf و Bar: واکنش PCR ۹۶ نمونه DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و پالپ پر با آغازگرهای Baf و Bar بغیر از شش نمونه همه دارای DNA جوجه قابل تکثیر بودند و در ۹۰ نمونه در الکتروفورز باند 401bp مشاهده گردید. بدین ترتیب ۹۰ نمونه DNA استخراج شده برای مطالعه مولکولی پرویروس J انتخاب شد، (تصویر۱).

واکنش PCR با جفت آغازگر H5/H7: همه ۹۰ نمونه DNA استخراج شده در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی و مارکر انجام گرفت. علی رغم اینکه



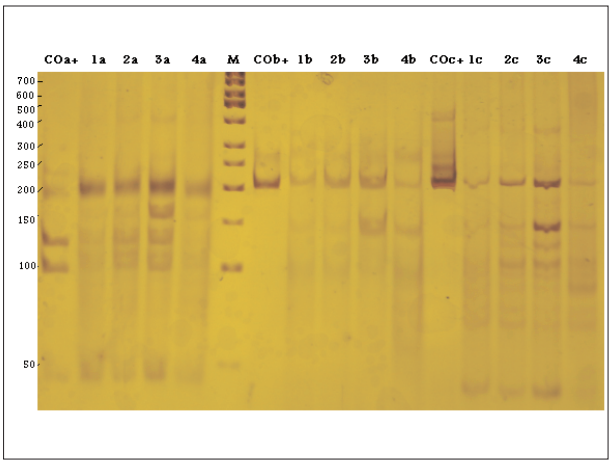
تصویر۲- واکنش PCR nested نمونه DNAهای استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و پالپ پر (1,2,3,4,5,6) با استفاده از آغازگر آغازگرهای نستد Leu3.2 F، Leu7R (جفت آغازگر خارجی) و Leu11F۲ Leu12R (جفت آغازگر داخلی)، +CO؛ کنترل مثبت (پلاسمید حامل پرووریوس آمیخته HPRS-103). -CO؛ کنترل منفی. M؛ DNA مارکر 50bp (Fermentas).

کنترل مثبت در واکنش PCR تکثیر و با الکتروفورز باند 545bp قابل مشاهده داشت، هیچکدام از نمونه‌های مورد آزمایش مثبت نبودند.

واکنش PCR با جفت آغازگر H5/H7b: همه ۹۰ نمونه DNA استخراج شده در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی و مارکر انجام گرفت. علی رغم اینکه کنترل مثبت در واکنش PCR تکثیر و با الکتروفورز باند 544bp قابل مشاهده داشت، هیچکدام از نمونه‌های مورد آزمایش مثبت نبودند.

واکنش PCR با جفت آغازگر J52/J32: همه ۹۰ نمونه DNA استخراج شده در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی و مارکر انجام گرفت. علی رغم اینکه کنترل مثبت در واکنش PCR تکثیر و با الکتروفورز باند حدود 2125bp قابل مشاهده داشت، هیچکدام از نمونه‌های مورد آزمایش، مثبت نبودند.

واکنش PCR با آغازگرهای نستد (nested) F Leu3.2، Leu7R (جفت آغازگر خارجی) و Leu11F۲ Leu12R (جفت آغازگر داخلی): همه ۹۰ (از هر آمیخته ۱۵ نمونه) نمونه DNA استخراج شده در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی و مارکر انجام گرفت، همانطور که به عنوان نمونه در تصویر ۲ مشاهده می‌گردد ۲۲ مورد از نمونه‌ها همانند کنترل مثبت باند 210bp داشتند، لذا مشکوک به آلوده بودن به پرویروس J بودند (تحت گروههای A,C,J باند 210bp با آغازگرهای نستد تولید می‌کنند)، در آمیخته C، شش نمونه مثبت بود که سه نمونه آن DNA استخراج شده از خون، دو نمونه مربوط به DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما و یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر بود؛ در آمیخته D شش نمونه مثبت شد که یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از خون، سه نمونه مربوط به DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما و دو نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر بود؛ در آمیخته E پنج نمونه مثبت بود که چهار نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر و یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما بود؛ در



تصویر ۳- الکتروفورز پلی آکریل آمید محصول nested-PCR که تحت تاثیر آنزیمهای محدود کننده قار گرفته: نمونه‌های COa+,1a,2a,3a,4a تحت تاثیر آنزیم DdeI قرار گرفته؛ نمونه‌های Cob+,1b,2b,3b,4b تحت تاثیر آنزیم TaqI قرار گرفته؛ و نمونه‌های COc+,1c,2c,3c,4c تحت تاثیر هیچ آنزیمی نبوده. +CO؛کنترل مثبت (پلاسمید حامل پرووایروس سویه HPRS-103). M؛ DNA مارکر 50bp (Fermentas).

آمیخته A سه نمونه مثبت شد که یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از خون و دو نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر بود؛ و در آمیخته F دو نمونه مثبت شد که یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر و یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما بود؛ در آمیخته B نمونه مثبت مشاهده نگردید.

در اکثر محصولات واکنش نستد مثبت علاوه بر باند 210bp باند حدود 160bp نیز داشتند، (تصویر ۳،۲). با توجه به اینکه آغازگرهای نستد ویژه همه ویروس‌های اگزوژن است و با توجه به مطالعات قبلی (۶) احتمالا باند مورد ذکر مربوط به تحت گروه D می‌باشد که البته نیاز به مطالعه بیشتر می‌باشد.

آنالیز با آنزیمهای محدود کننده و الکتروفورز با پلی آکریل آمید ژل: نتایج چهار نمونه آزمایش RLFP محصول nested PCR در تکنیک پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز در تصویر ۳ نمایش داده شده است. از ۲۲ نمونه مثبت محصول nested PCR، ۱۵ نمونه تحت تاثیر آنزیم‌های محدود کننده قرار گرفت، همه تحت تاثیر آنزیم DdeI همانند کنترل مثبت به دو قطعه 120bp و 90bp تقسیم شدند ولی تحت تاثیر آنزیم TaqI قرار نگرفتند، لذا باند 210bp مربوط به پرویروس J می‌باشد. به نظر می‌رسد باند حدود 160bp تحت تاثیر آنزیم TaqI قرار گرفته ولی بدلیل غلظت پایین آن قطعات حاصل قابل مشاهده نیست، از آنجا که باند مذکور تحت تاثیر آنزیم DdeI هضم نشده احتمالا مربوط به تحت گروه D ویروسهای لکوز پرندگان باشد.

بحث

ظهور تحت گروه J ویروس لکوز پرندگان (ALV-J) در پانزده سال پیش و تبدیل آن به مساله جهانی در کوتاه ترین زمان همراه با توانایی تغییرات آنتی ژنیکی سریع، توجه محققان را جلب کرد(۱۵). در سال ۱۹۸۸ ضمن مطالعه وضعیت ویروسهای لکوز پرندگان (ALVs) پنج جدایه جدید ویروس لکوز پرندگان از جوجه‌های مادر گوشتی جدا و تحت نامهای HPRS-100 تا 104-HPRS نامگذاری شدند. جدایه‌های جدید به دلیل تفاوت در ارزیابی انترفرانس، ردیف میزبانی و تفاوت در پروتئین‌های غشای ویروس با سایر تحت گروهها، در تحت گروه جدیدی با عنوان تحت گروه J قرار گرفتند(۱،۵).

با توجه به مطالعات انجام گرفته این مطالعه به جهت بررسی وضعیت J-ALV در گله‌های اجداد گوشتی ایران و ارزیابی بعضی از روشهای تشخیصی موجود در سطح فارم انجام گرفت.

تغییرات آنتی ژنیک و تشابه ردیفهای نوکلئوتیدی ویروسهای تحت گروه J با سایر گروههای اگزوژن و آندوژن از یک طرف باعث کاهش حساسیت تکنیک PCR(۹،۱۵) و از طرف دیگر در صورت عدم دقت در طراحی آغازگرهای اختصاصی(۱۴) و انتخاب قسمت‌های از ژنوم که احتمال ایجاد تغییر وجود دارد(۱۲)، باعث افزایش نمونه‌های کاذب مثبت می‌شود؛ ولی با توجه باینکه با این تکنیک(در صورت اصلاح و مراقبت از آغازگرها و تست مرتب آنها)، می‌توان گله‌های اجداد و مادر گوشتی آلوده را قبل از انتقال عمودی شناسایی کرد(۱۱،۱۲)، کمک زیادی در کنترل بیماری می‌کند؛ برای افزایش حساسیت و ویژگی تکنیکهای مولکولی آغازگرهای متعددی از قسمتهای مختلف ژنوم ویروس تحت گروه J، بخصوص از نواحی pol,env,LTR تهیه شده و مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است(۴،۱۱،۱۵).

تشخیص جوجه‌های آلوده بلافاصله بعد از هچ با روشهای سریع، اختصاصی و حساس کمک زیادی در کنترل عفونت ALV-J می‌کند. مطالعات مقایسه‌ای زیادی (بصورت تجربی) در ارتباط با روش PCR، PCR-RT، جداسازی، ایمنوفلورسانس و خنثی سازی انجام گرفته است (۶،۱۱،۱۲،۱۴،۱۷). استفاده مستقیم از PCR برای تشخیص و عدم نیاز به کشت سلول(۱۱)، حساسیت بالای روش PCR در مقایسه با روش RT-PCR(۱۱)، همچنین عدم اختلاف آماری نتایج حاصل از PCR با نتایج حاصل از روش جداسازی در انتقال افقی و حتی در مواردی مناسب بودن روش PCR در مقایسه با روش جداسازی(۱۲)، موجب شده از آن به عنوان یک روش مناسب در تشخیص عفونت ALV-J استفاده شود. در تشخیص عفونت‌های ویرمیک موقت، روش PCR در مقایسه با روش‌های خنثی سازی یا جداسازی، بهتر است(۶).

دراین مطالعه علی رغم بررسی نمونه‌های DNA با چندین آغازگر اختصاصی(۶،۱۲،۱۷) و استفاده از کنترل مثبت و کنترل منفی، تنها با روش nested-PCR، و به کمک آنزیم‌های محدود کننده نمونه‌های مثبت پرووایروس تحت گروه J شناسایی شد.

با تاکید مجدد بر این نکته که آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR-nested، قادر به شناسایی کلیه رتروویروسهای اگزوژن است و بر اساس مطالعه انجام شده توسط Garcia و همکاران در سال ۲۰۰۳، تکثیر DNA ویروسهای تحت گروه A,C,J با آغازگرهای نستد، به طور مشترک باند حدود 210 bp تولید می‌کنند و تکثیر DNA تحت گروههای D و B به ترتیب باندهای 175bp و 220bp تولید می‌کنند؛ تفریق تحت گروههای A,C و J برای رسیدن

به نتیجه قطعی ضروری است. برای این منظور محصول واکنش PCR-nested هریک از نمونه‌های که حاوی قطعه 210bp بود، تحت تاثیر دو آنزیم DdeI و TaqI قرار گرفت، آزمایش پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز نشان داد قطعه 210bp همه نمونه‌ها متعلق به ویروس تحت گروه J می‌باشد. چون قطعه 210bp با آنزیم DdeI به دو قطعه 120bp و 90bp هضم شد ولی تحت تاثیر آنزیم TaqI قرار نگرفت(۶).

در مورد واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروس تحت گروه J پرندگان، با توجه باینکه تمام نمونه‌های مورد مطالعه در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی انجام گرفته بود، بنابر این در واکنش PCR خطای کار وجود نداشت و دلایل منفی شدن نمونه‌ها با این آغازگرها می‌تواند حساسیت کم این آغازگرها در مقایسه با پرایمرهای نستد و تغییرات آنتی ژنیکی در پروویرسهای تحت گروه J در نمونه‌های مورد مطالعه باشد(۳،۱۰،۱۵،۱۶). دو جفت آغازگر H5/H7 و H5/H7b حداکثر قادر به شناسایی ۲۴۰ کپی از پلاسمید نوترکیب است(۱۲)، با توجه باینکه هر نمونه DNA استخراج شده در این مطالعه از مخلوط ۱۰ نمونه مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و یا پالپ پر بود، لذا ممکن است DNAهای آلوده به پروویروس به اندازه‌ای رقیق شده باشد که قابل شناسایی و اتصال با آغازگرهای مذکور نباشد. در مورد تغییرات آنتی ژنیک، با توجه باینکه آغازگرهای مذکور به نواحی قابل تغییر(ژن pol و ژن env) متصل و باعث تکثیر قسمتی از آنها می‌شود(۱۳،۱۵)، لذا ممکن است دلیل منفی شدن آزمایش PCR با این آغازگرها تغییرات آنتی ژنیک در ناحیه اتصال آغازگرها باشد.

در مورد واکنش PCR نمونه‌های مورد آزمایش با آغازگرهای, J5,/J3 به خاطر آن که آغازگرهای مذکور همه ناحیه ژن env را تکثیر می‌کند و باند حدود 2125bp تولید می‌کند، ضمن اینکه دلایل فوق در مورد این آغازگرها نیز صادق است، چون آغازگر همه ناحیه env را تکثیر می‌کند لذا نیاز به DNA الگو با غلظت بالاتری می‌باشد(۹).

در مورد باند حدود 160bp چون با آنزیم DdeI هضم نشده(۶). با توجه باینکه این باند در نمونه‌های DNA استخراج شده از پالپ پر نیز مشاهده می‌شود و با توجه به آگاهی از این نکته که ویروس تحت گروه D بدلیل عدم تمایل به پالپ پر(۲) قاعدتا نباید در نمونه‌های مذکور مشاهده شود، فلذا نیاز به بررسی بیشتری است.

نتایج نشان داد اکثر آمیخته‌های گوشتی موجود در ایران به ویروس تحت گروه J لکوز پرندگان آلوده است. همچنین مشخص شد با مخلوط کردن نمونه‌ها و استفاده از روش مولکولی حساس تر (nested-PCR) انجام مطالعه فارمی ویروس تحت گروه J لکوز پرندگان تسهیل می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به جهت تامین بودجه این مطالعه و از همکاری سازمان دامپزشکی کشور تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از آقای دکتر Venugopal به خاطر ارسال نمونه کنترل مثبت تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Bai, J., Howes, K., Payne, L. N., Skinner, M. A. (1995) Sequence of host-range determinants in the *env* gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J). J. Gen. Virol. 76: 181-187.
2. Bai, J., Payne, L. N., Skinner, M. A. (1995) HPRS-103(exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an envgene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcomaviruses. J. Virol. 69: 779-784.
3. Cui, Z., Zhang,Y., Du, Z., Silva, R. F. (2003) Comparison of Chinese field strain of avian leucosis subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains. Avian. Dis. 47: 1321-1330.
4. Fadly, A. M. (2000) Isolation and identification of avian leukosis viruses: A review. Avian. Pathol. 29: 529-535.
5. Fadly, A.M., Payne, L. N. (2003) Leukosis/ Sarcoma group in Saif,Y. M., J. H. Barns, C. W. Beard, L. R. Macdougold., Disease of poultry. 11th ed.,Iowa state university press. Iowa,USA. pp.465-516.
6. Garcia, M., Attrache, J.E., Riblet, S.M., Lunge, V. R., Fonseca, A. S. K., Villegas, P., Ikuta, N. (2003) Development and application of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction test for the detection of exogenous avian leukosis virus. Avian. Dis. 47: 41-53.
7. Lupiani, B., Williams, S. M., Silva, R. F., Hunt, D., Henry, A., Fadly, A. M. (2003) Pathogenicity of Two Recombinant Avian Leukosis Viruses. Avian Dis. 47: 425-432.
8. Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) Molecular cloning a laboratory Manuel 3rd ed., CSHL press, New York.USA. 5.40-5.48, A9.6- A9.7.
9. Silva, R. F., Fadly, A. M., Hunt, H. D. (2000) Hyper variability in the envelope genes of subgroup J avian leukosis viruses obtained from different farms in the United States. Virol. 272: 106-111.

10. Smith, E. J., Fadly, A.M. (1979) An enzyme- linked immunosorbent assay for detecting avian leukosis-sarcoma virus. Avian. Dis. 23: 698- 707.
11. Smith, E. J., Williams, S. W., Fadly, A. M. (1998) Detection of avian leukosis virus subgroup J using the polymerase chain reaction. Avian. Dis. 42: 375-380.
12. Smith, L. M., Brown, S. R., Howes, K., McLeod, S., Arshad, S. S., Barron, G. S., Venugopal, K., McKay, J. C., Payne, L. N. (1998) Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus. Virus Res. 54: 87-98.
13. Spackman, E., Pope, C. R., Could, S.S., Rosenberger, J. K. (2003) The effects of avian leukosis virus subgroup J on broiler chicken performance to vaccination. Avian. Dis. 47: 618-626.
14. Spencer, J. L., Chan, M., Nadin-Davis, S. (2000) Relationship between egg size and subgroup J avian leukosis virus in eggs from broiler breeders. Avian. Pathol. 29: 617-622.
15. Venugopal, K. (1999) Avian leucosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses, a review. Res. Vet. Sci. 67: 113-119.
16. Venugopal, K., Smith, L. M., Howes, K., Payne, L. N. (1998) Antigenic variants of J subgroup avian leukosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in the env gene. J. Gen. Virol. 79: 757-766.
17. Zavala, G., Jack wood, M. W., Hilt, D. A. (2002) Polymerase chain reaction for detection of avian leucosis virus subgroup J in feather pulp. Avian. Dis. 46: 971-978.

J.Vet.Res. 64,1:7-14,2009

MOLECULAR STUDIES ON AVIAN LEUKOSIS VIRUS SUBGROUP J (ALV-J) INFECTIONS IN GRANDPARENT FLOCKS IN IRAN

Rajabi, Z., Bozorgmehrifard, M.H.*, Peighambari, S.M.

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 17 July 2007 , Accepted 11 March 2008)

Abstract:

Subgroup J Avian Leukosis Virus (ALV-J) was isolated in the late 1980s from meat-type chickens in the United Kingdom. ALV-J with exception of some acute variants, cause myeloid leukosis in meat-type chickens with long incubation period.In this study while the status of Avian Leukosis Virus Subgroup J in six different strain of broiler grandparent flocks of Iran evaluated, the evaluation of different primers and some molecular methods also were done. For this reason, 100 blood samples, which had EDTA, 100 mixed of white blood cells and plasma and 100 feather pulps were collected from one farm of each broiler grandparent strain. PCR and nested PCR were methods that used for the study. In molecular study before the extraction of DNA from samples; In order to decrease the number of samples, 10 mixed of white blood cells and plasma, blood or feather pulp pooled. In molecular study with PCR all of samples were negative, but in nested PCR reaction, from six broiler strains, five strains infected to ALV-J. The results indicate that the most of broiler strains in Iran have been infected to ALV-J. The results also indicate that we can simply use pooled samples for the study of ALV-J in a flock by nested-PCR test.

Key words: broiler grandparent, ALV-J, PCR, nested-PCR.

***Corresponding author's email: mhbfard@ut.ac.ir, Tel: 021-61117045, Fax: 021-66933222**