مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۲، ص ۱۷۰-۱۶۳
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,2: 163-170, 2015

ارتباط مجتمع عمده پذیرش بافتی طیور با پاسخ پادتن به واکسن

غلامرضا نیکبخت[1*] عاطفه اسماعیل نژاد[2] ندا خازنی اسکوئی[1]
۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران
۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز-ایران

(دریافت مقاله: ۱ بهمن ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۳۰ فروردین ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) نقشی مرکزی در چگونگی پاسخ به بیماریهای عفونی دارد و پاسخ‌های ایمنی تحت کنترل ژن‌های این مجتمع هستند. بدلیل تنوع MHC تفاوت‌های فردی در پاسخ به واکسن‌های مختلف طیور مشاهده می‌شود. بررسی ارتباط آلل‌های MHC طیور با توان پاسخ به واکسن‌های معمول، به توفیق واکسیناسیون و کنترل بیماریها کمک خواهد نمود. **هدف:** هدف از مطالعه حاضر بررسی تنوع MHC در جمعیت طیور بومی خراسان و ارتباط آن با پاسخ پادتن به واکسن‌های گامبورو، نیوکاسل و آنفلوانزا است. **روش‌کار:** به منظور تعیین ژنوتیپ‌های MHC از نشانگر ریزماهواره LEI۰۲۵۸ و روش تحلیل قطعه‌ای استفاده شد. عیار پادتن تولید شده بر ضد واکسن‌های نیوکاسل و آنفلوانزا با آزمون ممانعت هماگلوتیناسیون و واکسن گامبورو با آزمون الایزا اندازه‌گیری شدند. تحلیل آماری با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ صورت پذیرفت. جهت تعیین ضرایب تأثیر آلل‌ها از تحلیل رگرسیون تک متغیره با روش حداقل مربعات استفاده شد. **نتایج:** در جمعیت طیور بومی خراسان ۱۳ آلل ریزماهواره LEI۰۲۵۸ شناسایی شد که نشان‌دهنده تنوع بالای MHC در این جمعیت است. آلل ۳۶۱ بیشترین (۲۸/۴۸٪) و آلل ۳۵۰ کمترین (۰/۶۹٪) فراوانی را در جمعیت داشتند. در بررسی ارتباط MHC با پاسخ ایمنی، آلل ۲۶۶ ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با کاهش عیار پادتن ضد واکسن گامبورو و آلل‌های ۳۱۱ و ۳۱۳ با افزایش پاسخ پادتن به واکسن نیوکاسل همراه بودند ($p<0/05$). **نتیجه‌گیری‌نهایی:** با توجه به نقش قابل ملاحظه MHC در مقاومت یا حساسیت در برابر بیماریهای عفونی ویروسی و کیفیت پاسخ‌های ایمنی، از روش‌ها و نتایج بدست آمده می‌توان برای انتخاب و بهبود جمعیت‌های در حال اصلاح نژاد بهره برد.

واژه‌های کلیدی: گامبورو، آنفلوانزا، مجتمع عمده پذیرش بافتی، ریزماهواره، نیوکاسل

مقدمه

صنعت طیور یکی از مهم‌ترین منابع تأمین غذا در سراسر دنیا بوده و از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است (۸). در طی دهه‌های گذشته این صنعت به سمت انتخاب لاین‌های تجاری با رشد و تولید بیشتر و ضریب تبدیل کمتر پیش رفته است، اما متأسفانه چنین فشارهایی با کاهش تنوع ژنتیکی، اختلالات فیزیولوژیک و ضعف کلی در دستگاه ایمنی همراه هستند (۱۵). کاهش تنوع ژنتیکی منجر به ایجاد جمعیت‌هایی می‌شود که توان مقابله با بیماریهای جدید را نخواهند داشت و این امر برای صنعت طیور خطری جدی به شمار می‌رود (۱۲،۲۹). طیور نسبت به بیماریهای مختلف باکتریایی، ویروسی و انگلی حساس هستند که برخی از آنها کشنده بوده و تقریباً تمامی آنها باعث اختلال در رشد و تولیدمثل می‌شوند (۳). از مهمترین بیماریهای ویروسی در جمعیت‌های طیور می‌توان به بیماری بورس عفونی (گامبورو)، نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان اشاره کرد. هر سه این بیماریها بسیار حاد و واگیردار هستند و می‌توانند میزان واگیری و مرگ و میر بالایی (بیش از ۵۰٪) در طیور و به ویژه پرندگان جوان ایجاد کرده و یا موجب کاهش رشد، عدم وزن‌گیری، کاهش کیفیت و تولید تخم‌مرغ و تضعیف سیستم ایمنی شوند (۱۳،۱۹،۲۳،۲۶).

در حال حاضر بهترین راهکار جهت کنترل بیماریها، استفاده از واکسن‌های مؤثر و بهبود شرایط پرورشی است. تولید انواع واکسن‌ها هزینه بالایی داشته و همواره با خطر بروز سویه‌های مقاوم همراه است (۵،۱۹،۲۰). در چند سال اخیر برنامه‌های اصلاح نژاد طیور در راستای شناسایی و انتخاب جمعیت‌های مقاوم به بیماریها نیز پیش رفته است. بطور کلی مطالعات ژنتیکی در جهت تولید لاین‌های مقاوم به بیماریها و یا با صفت پاسخ‌دهی بهتر به واکسن‌ها و همچنین صفات تولیدی برتر به تازگی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. اکنون تشخیص مقاومت ژنتیکی به بیماریها با اهداف کنترل و پیشگیری، یک اصل کاربردی در اصلاح نژاد است (۵،۲۰،۲۹،۳۵).

در طیور مهمترین و مؤثرترین ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت نسبت به بیماریها در خوشه ژنی مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) قرار دارند (۲۷). این خوشه ژنی که در گونه‌های دیگر نیز وجود دارد، مولکول‌هایی را کد می‌کند که مسئول عرضه پادگن در سطح سلول‌ها هستند (۳۲). MHC در طیور (مجتمع B) به شکلی بسیار متراکم بر روی بازوی کوتاه میکروکروموزوم ۱۶ قرار دارد و تنها ژن‌های ضروری را دارا است. بطور کلی MHC طیور شامل دو جایگاه ژنتیکی B و Rfp-Y (Restriction fragment pattern-Y) است که توسط یک ناحیه غنی و تکراری از ژن‌های RNA ریبوزومی (Nuclear organizing region (NOR)) از یکدیگر جدا شده‌اند. ژن‌های کلاسیک MHC که مسئول عرضه پادگن‌ها به لمفوسیت‌های T هستند در جایگاه B قرار داشته و مانند ژن‌های MHC در سایر گونه‌ها از تنوع بالایی برخوردارند (۲۱). جایگاه B در طیور

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۵۷ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: nikbakht@ut.ac.ir

شامل ۳ کلاس یک، دو و چهار (I، II و IV) و به ترتیب با نام‌های BF، BL و BG است. ملکول‌های کلاس I و II تنوع بالایی داشته و مسئول عرضه پادگن‌های داخلی و خارجی به سلول‌های T هستند (۹،۲۱). جهت بررسی تنوع MHC از روش‌های ملکولی مختلفی استفاده شده است. یکی از این کارآمدترین این روش‌ها استفاده از نشانگر ریزماهواره LEI۰۲۵۸ است. ریزماهواره LEI۰۲۵۸ در میکروکروموزموم ۱۶ طیور قرار گرفته و با آلل‌های مناطق BL، BF و BG در عدم تعادل پیوستگی است. میزان تنوع آللی در ژنوتیپ‌های این ریزماهواره شاخص تنوع‌هاپلوتیپ‌های خوشه ژنی MHC طیور است (۱۱،۲۲).

ارتباط بین ژن‌های MHC با مقاومت یا حساسیت نسبت به برخی از عوامل بیماریزا مانند ویروس عامل بیماری مارک (۱)، ویروس عامل بیماری بورس عفونی (۶)، ویروس تومور سارکومای روس (۳۱)، ویروس عامل نیوکاسل (۲۰)، ویروس لکوز پرندگان (۳۳)، ویروس عامل آنفلوانزای ماکیان (۳،۱۳) و باکتری‌هایی مثل استافیلوکوک و سالمونلا (۱۶) شناخته شده است. علاوه بر این، در سال‌های اخیر گزارش‌هایی مبنی بر اهمیت MHC در پاسخ ایمنی نسبت به برخی واکسن‌ها در طیور نیز منتشر شده است. بنابر آنچه تاکنون گفته شد، این مطالعه با هدف بررسی تنوع MHC و ارتباط ژنوتیپ‌های آن با تولید پادتن در پاسخ به واکسن‌های گامبورو، نیوکاسل و آنفلوانزا در جمعیت طیور بومی منطقه خراسان انجام شد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه و استخراج DNA ژنومی: در این مطالعه ۷۲ نمونه خون کامل (۳۰ نمونه از والد نر و ۴۲ نمونه از جوجه‌ها) از مرکز اصلاح نژاد و پشتیبانی مرغ بومی خراسان رضوی و بر اساس فرمول ارائه شده توسط Bashalkhanov و همکاران در سال ۲۰۰۹ تهیه شد (۲). مرکز اصلاح نژاد و پشتیبانی مرغ بومی خراسان در سال ۱۳۶۴ در مشهد و به منظور حفظ و حراست از ذخایر پر ارزش ژنتیکی مرغ بومی، بررسی و شناسایی پتانسیل تولیدی، اصلاح نژاد و بهبود صفات تولیدی در مرغ بومی خراسان احداث شده است. در حال حاضر جمعیت این مرکز تحت برنامه اصلاح نژاد به منظور افزایش تعداد تخم مرغ، افزایش وزن تخم مرغ و کاهش سن بلوغ جنسی قرار دارند. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA و در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (BIONEER، کره) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب به کمک روش‌های اسپکتروفتومتری و ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعیین ژنوتیپ‌های MHC: تعیین ژنوتیپ‌های MHC با تمرکز بر نشانگر ریزماهواره LEI۰۲۵۸ و به کمک روش تحلیل قطعه‌ای انجام شد. برای تکثیر این نشانگر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ µL شامل ۲۰ng DNA ژنومی، ۱۰ pM از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی ریزماهواره مذکور، ۱/۵mM کلرید منیزیم و یک واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq Fermentas، آلمان) صورت گرفت. چرخه‌های دمایی شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، ۳۵ چرخه سه مرحله‌ای، شامل مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۷°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در انتها یک مرحله بسط انتهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه بود. آغازگرهای ریزماهواره LEI۰۲۵۸ (به شماره دسترسی Z۸۳۷۸۱ در بانک ژن) مورد استفاده قرار گرفتند: '۵-CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG-'۳ آغازگر رفت و '۵-AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC-'۳ آغازگر برگشت.

برای تحلیل قطعه‌ای، ابتدا آغازگر رشته پیشروی مرتبط با ریزماهواره مورد نظر LEI۰۲۵۸ با رنگ فلورسنت FAM-۶ نشاندار شده (رنگ به قسمت '۵ آغازگر متصل می‌شود) و سپس در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت. پس از تکثیر آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با آغازگر نشاندار، ۵ µL از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز ۴٪ به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شده و پس از مشاهده باند قوی و مناسب، نمونه‌ها برای انجام تحلیل قطعه‌ای انتخاب شدند. به منظور انجام تحلیل قطعه‌ای، ۰/۵ µL از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۰/۵ µL از نشانگر وزنی LIZ Size standadrd, ۵۰۰ Gene Scan) GS۵۰۰LIZ Applied Biosystems) و ۹ µL فرمامید ترکیب شده و ۳ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار گرفتند. قطعات DNA تک رشته‌ای شده بلافاصله به روی یخ انتقال داده شده و سپس با استفاده از دستگاه آنالایزر ژنتیکی ABI ۳۱۳۰ تفکیک شدند (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). در نهایت نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Peack scanner نسخه ۱/۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تحلیل ژنتیک جمعیت: آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ بر اساس اندازه شناسایی شدند. تعداد آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مشاهده شده، فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، میزان هتروزیگوسیتی و هوموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار توسط نرم افزار POP GENE نسخه ۱/۳۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. انحراف از تعادل‌هاردی-وینبرگ در هر جایگاه نیز با استفاده از آزمون نسبت درست‌نمایی و با استفاده از نرم‌افزار SAS/Genetics بررسی شد.

ارزیابی پاسخ پادتن بر ضد واکسن‌های گامبورو، نیوکاسل و آنفلوانزا: واکسیناسیون جمعیت بومی خراسان بر ضد سه بیماری مهم گامبورو، نیوکاسل و آنفلوانزا توسط مرکز اصلاح نژاد و به قرار زیر انجام گرفته است: ۱۰ روزگی واکسن دوگانه کشته نیوکاسل و آنفلوانزا به روش تزریق زیر جلدی (Newpasol۱۰۲، پسوک) همراه با واکسن زنده نیوکاسل به صورت قطره چشمی (Hitchner B۱، رازی)، ۱۴ روزگی واکسن زنده گامبورو به صورت آشامیدنی (D۷۸، اینتروت)، ۱۷ و ۲۷ روزگی واکسن زنده نیوکاسل به صورت آشامیدنی (Clone+Ma۵ ۳۰، اینتروت)، ۲۳ و ۳۲

روزگی واکسن زنده گامبورو به صورت آشامیدنی (D۷۸، اینتروت) و ۱۰۰ روزگی واکسن سه گانه نیوکاسل، آنفلوانزا و گامبورو (Newpasol۱۰۳، پسوک). در روز ۱۲۰ دوره پرورشی، خونگیری از طریق سیاهرگ بال انجام گرفت و نمونه‌های سرم جدا شده تا زمان انجام آزمایش اندازه‌گیری پاسخ پادتن، در دمای ۲۰C° - نگهداری شدند.

عیار پادتن در پاسخ به واکسن گامبورو با استفاده از کیت الایزا (BIOCHECK، هلند) تعیین شد. جهت اندازه‌گیری پاسخ پادتن ضد واکسن‌های نیوکاسل و آنفلوانزا نیز آزمون مهار هماگلوتیناسیون (HI) انجام گرفت. به منظور انجام آزمون HI، ابتدا رقت‌های متوالی از سرم در میکروپلیت ۹۶ خانه ته گرد تهیه شده و سپس به هر حفره ۴ واحد پادگن تیتر شده با آزمون HA (سویه H۹N۲ برای آنفلوانزا و لاسوتا برای نیوکاسل) اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵C° قرار گرفت و سپس حجم مساوی از سوسپانسون یک درصد گلبول قرمز مرغ به تمامی حفره‌ها اضافه شد. پلیت مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵C° انکوبه شد. در پایان بالاترین رقت سرمی که ته نشین شدن مشخص گلبول قرمز را نشان می‌داد، به عنوان عیار HI در نظر گرفته شد.

بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های MHC با پاسخ پادتن: به منظور بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های MHC با پاسخ پادتن از مدل پیشنهادی Ewald و همکاران در سال ۲۰۰۷ استفاده شد (۱۰). در این مدل که به عنوان "مدل پدر" شناخته می‌شود، ارتباط آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با صفات فنوتیپی در پدرها بواسطه فرزندان آنها مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این مدل جهت تحلیل ارتباط آلل‌های ریزماهواره والد با یک صفت، از میانگین صفت کمی در فرزندان هر پدر استفاده می‌شود. برای این منظور تعداد ۳۰ والد نر و ۴۲ جوجه مربوط به این والدها مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی ارتباط آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با پاسخ پادتن با کمک مدل زیر انجام گرفت:

$$Yi=\mu+\Sigma\, b_h f_{ih}+€_i$$

که در آن Yi بیانگر میانگین عیار پادتن مورد نظر در فرزندان خروس i ام، μ میانگین عیار پادتن در کل جمعیت، f_{ih} فراوانی آلل hام در خروس iام، b_h نصف اثر جانشینی آلل hام و €i اثرات باقیمانده برای خروس iام است. €i معادل σ_e^2/Ni و Ni تعداد فرزندان خروس i ام است. در این مدل آللی که بیشترین فراوانی را داشت به عنوان آلل مبنا در نظر گرفته شد و اثرات سایر آل‌ها بر صفات فنوتیپی نسبت به این آلل مبنا سنجیده شد. در جمعیت بومی خراسان آلل ۳۶۱ به عنوان مبنا در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری: تحلیل آماری با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. جهت تعیین ضرایب تأثیر آلل‌ها از تحلیل رگرسیون تک متغیره با روش حداقل مربعات (Least square test) استفاده شد. در ابتدا ارتباط کلی ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با صفت تولید پادتن در پاسخ به واکسن‌های گامبورو، نیوکاسل و آنفلوانزا مورد ارزیابی قرار گرفت (PAll) و سپس در مواردی که ارتباط معنی‌داری (p_{All}<۰/۰۵) وجود داشت، تأثیر آلل‌های ریزماهواره به تفکیک بر پاسخ پادتن به واکسن مورد توجه قرار گرفت.

نتایج

در بررسی تنوع MHC در ۷۲ نمونه متعلق به جمعیت طیور بومی خراسان ۱۳ آلل از ریزماهواره LEI۰۲۵۸ (۱۹۴ تا ۴۲۵ جفت باز) مشاهده شد. آلل ۳۶۱ ریزماهواره LEI۰۲۵۸ بیشترین فراوانی (۲۸/۴۸٪) و آلل ۳۵۰ کمترین فراوانی (۰/۶۹٪) را داشتند (جدول ۱). در این جمعیت از مجموع ۱۳ آلل، ۳۱ ژنوتیپ (۵ ژنوتیپ هوموزیگوت و ۲۶ ژنوتیپ هتروزیگوت) مشاهده شد که ژنوتیپ ۳۱۳/۳۶۱ بیشترین فراوانی (۲۰/۸۳٪) را دارا بود. در جمعیت طیور بومی خراسان درصد بالایی از هتروزیگوسیتی نشان داده شد، بطوری که ۸۴٪ جمعیت در این جایگاه ژنتیکی هتروزیگوت ارزیابی شدند. در بررسی تعادل‌هاردی وینبرگ در جایگاه LEI۰۲۵۸، انحراف معنی‌داری از تعادل مشاهده نشد و جمعیت در تعادل‌هاردی وینبرگ قرار داشت (p=۰/۴۴۹).

در بررسی ارتباط MHC با پاسخ پادتن ابتدا ارتباط کلی ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با صفت تولید پادتن در پاسخ به واکسن‌های گامبورو، نیوکاسل و آنفلوانزا مورد ارزیابی قرار گرفت (PAll). در جمعیت بومی خراسان در مجموع ارتباط معنی‌داری بین ریزماهواره LEI۰۲۵۸ و پاسخ پادتن نسبت به هر سه واکسن گامبورو، نیوکاسل و آنفلوانزا مشاهده شد (p_{All}<۰/۰۵). در بررسی ارتباط تک تک آل‌ها با پاسخ پادتن ضد واکسن گامبورو، آلل۲۶۶ با کاهش عیار پادتن نسبت به آلل مبنا همراه بود (p>۰/۰۵). در مورد پاسخ ایمنی نسبت به واکسن نیوکاسل، آلل‌های ۳۱۱ و ۳۱۳ به طور معنی‌داری با افزایش پاسخ ایمنی همراه بوده‌اند (p<۰/۰۵). در مورد واکسن آنفلوانزا

جدول ۱. فراوانی آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ در جمعیت طیور بومی خراسان.

	آلل (bp)	تعداد	فراوانی (٪)
LEI۰۲۵۸	۱۹۴	۱۹	۱۳/۱۹
	۲۲۰	۱۰	۶/۹۴
	۲۴۶	۶	۴/۱۷
	۲۶۵	۳	۲/۰۸
	۲۶۶	۲	۱/۳۹
	۳۱۰	۱۱	۷/۶۴
	۳۱۱	۱۰	۶/۹۴
	۳۱۳	۳۲	۲۲/۲۲
	۳۵۰	۱	۰/۶۹
	۳۶۱	۴۱	۲۸/۴۷
	۳۸۱	۲	۱/۳۹
	۳۹۴	۴	۲/۷۸
	۴۲۵	۳	۲/۰۸
جمع	۱۳	۱۴۴	۱۰۰

جدول ۲. ارتباط آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با پاسخ آنتی بادی در جمعیت طیور بومی خراسان.

AI			ND			IBD		
P_{All}	p-value	ضریب تأثیر ریزماهواره LEI۰۲۵۸	P_{All}	p-value	ضریب تأثیر ریزماهواره LEI۰۲۵۸	P_{All}	p-value	ضریب تأثیر ریزماهواره LEI۰۲۵۸	LEI۰۲۵۸
۰/۰۰	۰/۸۲	-۰/۰۷۸	۰/۰۰	۰/۱۲	۰/۴۲۵	۰/۰۵	۰/۵۵	۲۲۹/۶	۱۹۴
	۰/۹۶	-۰/۰۲۵		۰/۲۴	۰/۴۸۴		۰/۹۲	-۸۵/۴	۲۲۰
	۰/۵۲	-۰/۲۵۸		۰/۹۰	۰/۰۳۸		۰/۸۷	-۷۳/۹	۲۴۶
	۰/۶۶	-۰/۲۷۸		۰/۶۸	-۰/۲۰۳		۰/۱۷	۱۰۳۸/۱	۲۶۵
	۰/۴۹	-۰/۲۸۳		۰/۱۱	۰/۵۲۱		۰/۰۴	-۱۰۱۹/۶	۲۶۶
	۰/۴۵	-۰/۲۸۳		۰/۶۰	۰/۴۲۵		۰/۲۲	۳۵۰/۴	۳۱۰
	۰/۹۸	-۰/۰۰۵		۰/۰۰۴	۰/۷۲۴		۰/۰۶	-۶۵۲/۷	۳۱۱
	۰/۴۶	-۰/۲۸۳		۰/۰۲۸	۰/۵۲۱		۰/۴۸	-۳۵۸/۲	۳۱۳
	۰/۷۶	-۰/۲۰۵		۰/۸۵	۰/۰۹۷		۰/۴۳	-۶۰۴/۲	۳۵۰
	۰/۶۴	۰/۲۱۹		۰/۶۶	۰/۱۵۹		۰/۸۴	-۱۱۰/۲	۳۸۱
	۰/۲۱	۰/۹۷۵		۰/۴۲	۰/۴۸۴		۰/۶۷	۳۶۸/۳	۳۹۴
	۰/۲۷	-۰/۳۴۸		۰/۸۷	۰/۰۴۰		۰/۱۲	-۶۹۹/۰	۴۲۵

اگرچه ارتباط معنی‌داری بین پاسخ پادتن و ریزماهواره LEI۰۲۵۸ وجود داشت (pAll>۰/۰۵)، اما هیچکدام از آلل‌های مورد مطالعه تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر افزایش یا کاهش عیار پادتن واکسن آنفلوانزا (نسبت به آلل مبنا) نشان ندادند (جدول ۲).

بحث

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که مقاومت در برابر بیماریها و پاسخ‌های ایمنی چند عاملی بوده و توسط چند جایگاه ژنی بر روی ژنوم کنترل می‌شوند. به نواحی ژنوم که این صفات را کنترل می‌کنند، جایگاه ژنی کنترل کننده صفات کمی (QTLs)گفته می‌شود. با توجه به ماهیت کمی و همچنین وراثت‌پذیری پایین صفات مقاومت در برابر بیماریها و پاسخ‌های ایمنی، مطالعه مستقیم بر روی ژن‌های کنترل‌کننده این صفات به منظور بررسی ارتباط آنها با سایر نشانگرها و انتخاب آنها در برنامه‌های اصلاح نژاد امکان پذیر نیست، اما می‌توان از نشانگرهای پیوسته با ژن‌های اصلی کنترل کننده صفت به منظور معرفی و یا حفظ و بقای آلل‌های سودمند و بهبود صفات در فرایند "انتخاب بر اساس نشانگر" استفاده کرد (۴،۲۴،۳۵).

یکی از مهمترین این نشانگرهای ژنتیکی در ماکیان خوشه ژنی MHC است که نقش آن در کنترل بسیاری از بیماریها و همچنین بهبود پاسخ‌های ایمنی در برابر واکسن‌های مختلف مشخص شده است. ارتباط‌هاپلوتیپ‌های مختلف MHC با پاسخ مناسب به واکسیناسیون و نحوه واکنش آنها نسبت به بیماریها، در طی دهه‌های گذشته در طیور به جزئیات شناسایی شده است. مطالعات مختلف به نقش مهم MHC در مقاومت یا حساسیت نسبت به برخی بیماریها، پاسخ‌های ایمنی و خصوصیات تولیدی در طیور اشاره کرده‌اند. به همین دلایل MHC به عنوان یک نشانگر با ارزش برای تحلیل‌های متمرکز در طیور، جهت انتخاب جمعیت‌های مقاوم به بیماریها، با پاسخ‌دهی بهتر به واکسن‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۱۰،۲۵).

در این مطالعه تنوع MHC و ارتباط آن با پاسخ ایمنی نسبت به سه واکسن گامبورو، نیوکاسل و آنفلوانزا در جمعیت طیور بومی خراسان بررسی شد. اولین بار Fulton و همکاران در سال ۲۰۰۶ از ریزماهواره LEI۰۲۵۸ برای تعیین‌هاپلوتیپ‌های MHC در طیور بومی و تجاری استفاده کردند و ۲۶ آلل از این ریزماهواره را شناسایی نمودند (۱۱). ریزماهواره LEI۰۲۵۸ در جمعیت طیور بومی خراسان (۱۳ آلل) در مقایسه با نژادهای تجاری مانند لگهورن سفید (۳ تا ۵ آلل) و نژاد گوشتی آرین (۱۱ آلل) از تنوع بالاتری برخوردار بود (۲۲،۲۵،۳۱). ولی این تنوع کمتر از سایر جمعیت‌های بومی مطالعه شده دنیا مثل طیور بومی ویتنام (۲۴ آلل)، تانزانیا (۲۳ آلل)، مرندی (۲۳ آلل)، چین (۲۰ آلل)، تایوان (۱۶ آلل) و برزیل (۱۵ آلل) مشاهده شد (۷،۱۴،۱۸،۲۰،۲۲،۲۸). توده‌های بومی معمولاً از نظر اندازه کوچک بوده و میزان تولید پایینی دارند، اما قابلیت‌های خاص آنها از جمله تنوع ژنتیکی بالاتر، مقاومت طبیعی به بیماریها، طول عمر بیشتر و نیاز غذایی کمتر، آنها را از نژادهای تجاری متمایز می‌کند. در جمعیت‌های بومی بسیاری از این خصوصیات منحصر به فرد مثل تنوع ژنتیکی و مقاومت نسبت به بیماریها در طی قرن‌ها و در نتیجه مواجهه با عوامل بیماریزای مختلف و تطابق با شرایط محیطی مختلف ایجاد شده است (۷،۲۸،۳۴). نتایج نشان می‌دهد که انتخاب طبیعی در جمعیت طیور بومی خراسان نیز در جهت انتخاب آلل‌های سودمند و حذف آلل‌های نامناسب پیش رفته است، زیرا آلل ۳۱۳ که با افزایش پاسخ ایمنی نسبت به واکسن نیوکاسل همراه است بعد از آلل مبنا (۳۶۱) بیشترین فراوانی را در جمعیت به خود اختصاص داده است،

در مقابل آلل ۲۶۶ مرتبط با کاهش عیار پادتن ضد گامبورو فراوانی بسیار پایینی داشته و در حال حذف شدن از جمعیت است. در مجموع از ۱۳ آلل شناسایی شده در مطالعه حاضر، تنها ۵ آلل ۱۹۴، ۲۶۵، ۳۱۳، ۳۶۱ و ۳۸۱ بین جمعیت‌های بومی خراسان، برزیل و ویتنام مشترک بودند (۱۱،۱۸،۲۸). ۷ آلل باقیمانده اختصاصی جمعیت طیور بومی خراسان بوده و تا کنون در هیچ نژاد دیگری در دنیا گزارش نشده است.

مطالعات محدودی به بررسی ارتباط آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با صفت تولید پادتن پرداخته‌اند. با توجه به نقش قابل ملاحظه آلل ۳۵۷ در مقاومت نسبت به بیماریها و همچنین فراوانی بالای آن در جمعیت طیور تجاری، در سایر مطالعات این آلل به عنوان مبنا در نظر گرفته شده است. طبق نتایج بدست آمده این آلل با افزایش عیار پادتن ضد واکسن گامبورو همراه است (۱۰). آلل ۱۸۲ با افزایش و آلل‌های ۱۹۴، ۴۸۷ و ۵۳۹ با کاهش پاسخ پادتن نسبت به واکسن کشته گامبورو مرتبط بوده‌اند (۱۷). در طیور بومی خراسان تنها آلل ۱۹۴ حضور داشت که ارتباط معنی‌داری بین این آلل و پاسخ پادتن نسبت به واکسن گامبورو مشاهده نشد.

Lwelamira و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز برای دو جمعیت از طیور بومی تانزانیا ارتباط بین آلل‌های این ریزماهواره را با پاسخ پادتن علیه واکسن نیوکاسل گزارش کرده‌اند. آلل ۲۰۵ در مطالعه اخیر بطور معنی‌داری با افزایش و آلل ۳۰۷ با کاهش پاسخ پادتن اولیه علیه واکسن نیوکاسل همراه بوده است (۲۰). هیچکدام از این آلل‌ها در جمعیت بومی خراسان مشاهده نشدند. در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین هیچکدام از آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ و پاسخ پادتن نسبت به واکسن نیوکاسل مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$).

در مورد نقش MHC در کنترل پاسخ ایمنی به ویروس آنفلوانزا اطلاعات ضد و نقیضی وجود دارد. اگرچه به ارتباط آلل ۳۵۷ با افزایش میزان زنده‌مانی و آلل ۲۰۵ با افزایش میزان مرگ و میر در برابر سویه‌های بسیار بیماریزای آنفلوانزا اشاره شده است، اما نقش MHC در کنترل این بیماری هنوز به وضوح مشخص نشده و صاحب‌نظران معتقدند پس‌زمینه ژنتیکی غیر از ژنوتیپ‌های MHC احتمالاً تأثیر بیشتری در کنترل این بیماری دارد (۳،۱۳،۳۰).

با توجه به نقش قابل ملاحظه MHC در کنترل مقاومت در برابر بیماریها و پاسخ‌های ایمنی، کسب اطلاعات در مورد این جایگاه ژنتیکی امکان استفاده از آن را در جهت انتخاب و بهبود جمعیت‌های در حال اصلاح نژاد فراهم خواهد کرد. لازم به ذکر است که برخی از ارتباطات ذکر شده بین MHC و ویژگی‌های ایمنی به نژاد وابسته بوده و ممکن است در سایر جمعیت‌ها مشاهده نشود. به علاوه پس زمینه ژنتیکی جمعیت و پیوستگی سایر ژن‌ها با MHC نیز در برقراری این ارتباط نقش بسیار مهمی دارد. به هر حال، در صورتی که طراحی یک برنامه اصلاح‌نژاد بر مبنای ژنتیک در جمعیتی مورد نظر باشد، ابتدا باید خصوصیات ژنتیکی و تنوع MHC و همچنین ارتباط آن با بیماریها در جمعیت هدف بطور دقیق مشخص شود. آن طور که نتایج حاصل از این تحقیق و همچنین مطالعات انجام شده بر روی طیور بومی ایران نشان می‌دهند(۲۲)، جمعیت طیور بومی خراسان آلل‌ها و ترکیب ژنتیکی (ژنوتیپ) متفاوتی از طیور بومی سایر نقاط جهان دارد و سوال پیش رو آن است که توان تولیدی جمعیت طیور بومی خراسان تا چه اندازه با سایر جمعیت‌ها تفاوت داشته و جایگزینی این توده‌های بومی با سویه‌های تجاری جهان تا چه اندازه به سود یا زیان ایران خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با مساعدت کارشناسان محترم مرکز اصلاح نژاد و پشتیبانی مرغ بومی خراسان رضوی و با بودجه طرح پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به شماره ۷۵۰۲۰۱۵/۶/۲۳ انجام شده است.

References

1. Bacon, L.D., Hunt, H.D., Cheng, H.H. (2001) Genetic resistance to Mareks disease. Curr Top Microbiol Immunol. 255: 121-141.
2. Bashalkhanov, S., Pandey, M., Rajora, O. (2009) A simple method for estimating genetic diversity in large populations from finite sample sizes. BMC. Genet. 10: 84.
3. Boonyanuwat, K., Thummabutra, S., Sookmanee, N., Vatchavalkhu, V., Siripholvat, V. (2006) Influences of major histocompatibility complex class I haplotypes on avian influenza virus disease traits in Thai indigenous chickens. Anim Sci J. 77: 285-289.
4. Bulut, Z., Kurar, E., Ozsensoy, Y., Nizamlioglu, M., Garip, M., Yilmaz, A., Caglayan, T., Dere, S., Kurtoglu, V., Dogan, M. (2013) Determination of chromosomal regions affecting body weight and egg production in Denizli X White Leghorn F2 populations. Eurasian J Vet Sci. 29: 30-38.
5. Bumstead, N. (1998) Genetic resistance to avian viruses. Rev Sci Technol. 17: 249-255.
6. Butter, C., Staines, K., Hateren, A., Davison, T.F., Kaufman, J. (2013) The peptide motif of the single dominantly expressed class I molecule of the chicken MHC can explain the response to a molecular defined vaccine of infectious bursal disease virus (IBDV). Immunogenetics. 65: 609-618.

7. Chang, C.S., Chen, C.F., Berthouly-Salazar, C., Chazara, O., Lee, Y.P., Chang, C.M., Chang, K.H., BedHom, B., Tixier-Biochard, M. (2011) A global analysis of molecular markers and phenotypic traits in local chicken breeds in Taiwan. Anim Genet. 43: 172-182.
8. Cheng, H.H. (2003) 21 Selection for disease resistance: Molecular genetic techniques. In: Poultry Genetics, Breeding, and Biotechnology. Muir, W.M., Aggrey, S.E. (eds.). (1st ed.) CABI Publishing, Wallingford, UK. p. 385-399.
9. Davison, T.T.F., Kaspers, B., Schat, K.A. (2008) Avian Immunology. (1st ed.) Elsevier Ltd. London, UK.
10. Ewald, S.J., Ye, X., Avendano, S., McLeod, S., Lamont, S.J., Dekkers, J.C. (2007) Associations of BF2 alleles with antibody titres and production traits in commercial pure line broiler chickens. Anim Genet. 38: 174-176.
11. Fulton, J.E., Juul-Madsen, H.R., Ashwell, C.M., McCarron, A.M., Arthur, J.A., O'Sullivan, N.P., Taylor Jr, R.L. (2006) Molecular genotype identification of the *Gallus gallus* major histocompatibility complex. Immunogenetics. 58: 407-421.
12. Hoffmann, I. (2009) The global plan of action for animal genetic resources and the conservation of poultry genetic resources. World Poult Sci J. 65: 286-297.
13. Hunt, H.D., Jadhao, S., Swayne, D.E. (2010) Major histocompatibility complex and background genes in chickens influence susceptibility to high pathogenicity avian influenza virus. Avian Dis. 54: 572-575.
14. Izadi, F., Ritland, C., Cheng KM. (2011) Genetic diversity of the major histocompatibility complex region in commercial and noncommercial chicken flocks using the LEI0258 microsatellite marker. Poult Sci. 90: 2711-2717.
15. Javanrouh Aliabad, A., Seyedabadi, H., Taheri Dezfuli, B. (2011) Association of insulin-like growth factor-I gene with body comosition traits in Iranian commercial broiler lines. World Appl Sci J. 14: 71-76.
16. Joiner, K.S., Hoerr, F.J., Van, S.E., Ewald, S.J. (2005) The avian major histocompatibility complex influences bacterial skeletal disease in broiler breeder chickens. Vet Pathol. 42: 275-281.
17. Juul-Madsen, H.R., Dalgaard, T.S., Rontved, C.M., Jensen, K.H., Bumstead, N. (2006) Immune response to a killed infectious bursal disease virus vaccine in inbred chicken lines with different major histocompatibility complex haplotypes. Poult Sci. 85: 986-998.
18. Lima-Rosa, C.A.d.V., Canal, C.W., Fallavena, P.R.V., Freitas, L.B.d., Salzano, F.M. (2005) LEI0258 microsatellite variability and its relationship to B-F haplotypes in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. Genet Mol Biol. 28: 386-389.
19. Luo, C., Qu, H., Ma, J., Wang, J., Li, C., Yang, C., Hu, X., Li, N., Shu, D. (2013) Genome-wide association study of antibody response to Newcastle disease virus in chicken. BMC Genet. 14: 42.
20. Lwelamira, J., Kifaro, G.C., Gwakisa, P.S., Msoffe, P.L.M. (2008) Association of LEI0258 microsatellite alleles with antibody response against Newcastle disease virus vaccine and body weight in two Tanzania chicken ecotypes. Afr J Biotechnol. 7: 714-720.
21. Miller, M.M., Bacon, L.D., Hala, K., Hunt, H.D., Ewald, S.J., Kaufman, J., Zoorob, R., Briles, W.E. (2004) 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. Immunogenetics. 56: 261-279.
22. Nikbakht, G., Esmailnejad, A., Barjesteh, N. (2013) LEI0258 Microsatellite Variability in Khorasan, Marandi, and Arian Chickens. Biochem Genet. 51: 341-349.
23. Norup, L.R., Dalgaard, T.S., Pedersen, A.R., Juul-Madsen, H.R. (2011) Assessment of Newcastle disease-specific T cell proliferation in different inbred MHC chicken lines. Scand J Immunol. 74: 23-30.
24. Notter, D.R. (1999) The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. J Anim Sci. 77: 61-69.
25. Owen, J.P., Delany, M.E., Cardona, C.J., Bickford, A.A., Mullens, B.A. (2009) Host inflammatory response governs fitness in an avian ectoparasite, the northern fowl mite (*Ornithonyssus*

sylviarum). Int J Parasitol. 39: 789-799.
26. Pitcovski, J., Cahaner, A., Heller, E.D., Zouri, T., Gutter, B., Gotfried, Y., Leitner, G. (2001) Immune response and resistance to infectious bursal disease virus of chicken lines selected for high or low antibody response to *Escherichia coli*. Poult Sci. 80: 879-884.
27. Schou, T.W., Labouriau, R., Permin, A., Christensen, J.P., Sorensen, P., Cu, H.P., Nguyen, V.K., Juul-Medsen, H.R. (2010) MHC haplotype and susceptibility to experimental infections (*Salmonella Enteritidis*, *Pasteurella multocida* or *Ascaridia galli*) in a commercial and an indigenous chicken breed. Vet Immunol Immunopathol. 135: 52-63.
28. Schou, T.W., Permin, A., Juul-Madsen, H.R., Sorensen, P., Labouriau, R., Nguyen, T.L., Fink, M., Pham, S.L. (2007) Gastrointestinal helminths in indigenous and exotic chickens in Vietnam: association of the intensity of infection with the major histocompatibility complex. Parasitology. 134: 561-573.
29. Sheldon, B.L. (2000) Research and development in 2000: Directions and priorities for the world's poultry science community. Poult Sci. 78: 147-158.
30. Sironi, L., Williams, J.L., Stella, A., Minozzi, G., Moreno, A., Ramelli, P. Han, J., Weigend, S., Wan, J., Lombardi, G., Cordioli, P., Mariani, P. (2011) Genomic study of the response of chicken to highly pathogenic avian influenza virus. BMC Proc 5 Suppl 4: S25.
31. Suzuki, K., Matsumoto, T., Kobayashi, E., Uenishi, H., Churkina, I., Plastow, G., Yamashita, H., Hamasima, N., Mitsuhashi, T. (2010) Genotypes of chicken major histocompatibility complex B locus associated with regression of Rous sarcoma virus J-strain tumors. Poult Sci. 89: 651-657.
32. Tizard, I.R. (2009) Veterinary Immunology. (8th ed.) Saunders Elsevier Ltd. New York, USA.
33. Weigend, S., Matthes, S., Solkner, J., Lamont, S.J. (2001) Resistance to Marek's disease virus in White Leghorn chickens: effects of avian leukosis virus infection genotype, reciprocal mating, and major histocompatibility complex. Poult Sci. 80: 1064-1072.
34. Weigend, S., Vef, E., Wesch, G., Meckenstock, E., Seibold, R., Ellendorff, F. (1995) Conception for conserving genetic resources in poultry in Germany. Archiv fuer Gefluegelkunde. 59: 327-334.
35. Yonash, N., Heller, E.D., Hillel, J., Cahaner, A. (2000) Detection of RFLP markers associated with antibody response in meat-type chickens: haplotype/genotype, single-band, and multiband analyses of RFLP in the major histocompatibility complex. J Hered. 91: 24-30.

Study of the association of major histocompatibility complex with antibody response to vaccines in Khorasan native chickens

Nikbakht, Gh.[1*], Esmailnejad, A.[2], Khazeni Oskoui, N.[1]

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz-Iran*

(Received 21 January 2015, Accepted 19 April 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Major histocompatibility complex (MHC) plays a central role in regulation and control of the immune responses to infectious diseases. Due to its polymorphism, individual differences in response to vaccines have been observed in different chicken populations. Studying the association of chicken MHC with immune response to vaccines will help the control of infectious disease and vaccination success. **OBJECTIVES:** The present study aimed to evaluate the MHC polymorphism and its association with antibody response against infectious bursal disease (Gumboro), Newcastle (ND) and Influenza (AI) vaccines in Khorasan native chickens. **METHODS:** Diversity of LEI0258 microsatellite marker (MHC genotyping) was investigated by fragment analysis method. Antibody titer against IBD was measured by ELISA and antibody titers against ND and AI vaccines were measured by Haemaglutination Inhibition (HI) assay. Statistical analysis was performed using SPSS software (version 21). Univariate regression analysis was performed using weighted least squares with weight number of progeny mean data. **RESULTS:** Total of 13 LEI0258 microsatellite alleles were identified in Khorasan native chickens which indicated a high genetic diversity in the population. The allele 361 bp had the highest (28.48%) and the allele 350 bp had the lowest (0.69%) frequency, respectively. In evaluating the association of MHC with immune responses, 311 and 313 bp alleles were significantly associated with elevated immune responses to Newcastle vaccine, while allele 266 bp was associated with lower IBDV antibody titers ($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** According to the important role of MHC in controlling infectious disease resistance or susceptibility and quality of immune responses, these results could be used for selection and improving the populations under selective breeding.

Keyword: Gumboro, influenza, major histocompatibility complex, microsatellite, Newcastle

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Frequency of LEI0258 microsatellite in Khorasan native chickens.

Table 2. Association of LEI0258 microsatellite alleles with antibody response in Khorasan native chickens.

***Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021-61117057, Fax: 021-66933222**