بسم الله الرحمن الرحیم

شماره ثبت : ۳۲۱

دانشکده دامپزشکی

دانشگاه فردوسی مشهد

پایان نامه

جهت دریافت درجه دکترای عمومی دامپزشکی(DVM)

عنوان

شناسایی ویروس نفریت عفونی به روش RT_PCR در گله‌های مبتلا به جراحات کلیوی

به کوشش :

فاطمه صباغ‌زاده فریز

استاد راهنما

دکتر محمدرضا باسامی

دکتر غلامعلی کلیدری

فروردین ۱۳۸۹

دانشگاه فردوسی مشهد
دانشکده دامپزشکی

پایان نامه

شناسایی ویروس نفریت عفونی به روش RT-PCR در گله‌های مبتلا به جراحات کلیوی

به کوشش
فاطمه صباغ زاده فریز

استاد راهنما
دکتر محمدرضا باسامی
دکتر غلامعلی کلیدری

فروردین ماه ۱۳۸۹

اظهار نامه

اینجانب فاطمه صباغ زاده فریز دانشجوی دوره ی دکتری رشته دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد نویسنده ی پایان نامه ی شناسایی ویروس نفریت عفونی به روش RT-PCR در گله‌های مبتلا به جراحات کلیوی تحت راهنمایی آقای دکتر محمدرضا باسامی و دکتر غلامعلی کلیدری متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه فردسی مشهد » و یا « Ferdowsi University of Mashhad» به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد .

به نام خدا

شناسایی ویروس نفریت عفونی به روش RT_PCR در گله‌های مبتلا به جراحات کلیوی

به کوشش

فاطمه صباغ‌زاده

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از

فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه دکترای حرفه ای

در رشته ی

دکترای حرفه ای دامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته پایان نامه در جلسه مورخ۸۹/۱/۲۳ با درجه ممتاز(۲۰ بیست) به تصویب هیات محترم داوران رسید.

استاد راهنما: دکتر محمدرضا باسامی	**استادیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد**
استاد راهنما: دکتر غلامعلی کلیدری	**دانشیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد**
استاد داور: دکتر جمشید رزمیار	**استادیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد**
استاد داور: دکتر اشرف میامئی	**استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد**

فروردین ماه ۱۳۸۹

تقدیم به :

بارگاه ملکوتی حضرت ثامن الحُجَج علی ابن موسیٰ الرّضا

ایزد منان را شاکرم که بر من منت نهاد تا در پرتو الطاف لایزالش توفیق آموختن در جوار بارگاه ملکوتی

ثامن الحجج علی بن موسی الرضا (ع) را پیدا نمایم.

تقدیم به :

پدرم

که وجودش برایم همه مهر است.

او که اطمینان نگاه و قلبش، امیدی جاودانه ام بخشید و دعای خالصانه اش

همواره گره گشای کارم شد.

مادرم

سمبل مهر، بی ریایی و ایثار در زندگیم

که زلال قلبش ریشه های احساسم را سیراب مهربانی و عشق کرد، و همواره امن ترین آغوش برای

تنهایی ها و خستگیهایم بوده و هست

تقدیم به تکیه گاه امنی

که زندگیم را به دستان پرتوانش می سپارم

به عشق باارزشی که

که حتی از آنچه در رویاهایم می یابم نیز زیباتر است

تقدیم به وحید عزیزم،

که آوای قلب مهربانش همواره عاشقانه است و پاک

تقدیم به برادرهای عزیزم

که وجودشان همه پاکی است و محبت

تقدیم به خانواده همسرم

به پاس مهربانی بی دریغ و همراهی پر مهرشان که برای من تبلور عشقند و تجلی ایثار

با تقدیر و تشکر فراوان از

جناب آقای دکتر باسامی

جناب آقای دکتر کلیدری

استاد راهنمای عزیزم که به دانش و پویایی، مهربانانه، راهم را آسانِ پیمودن نمود.

جناب آقای دکتر رزمیار

سرکارخانم دکتر میامیی

که برای گذراندن آخرین مرحله دانشجویی، بزرگوارانه یاریم کردند.

و با تشکر فراوان از:

- تمامی کارکنان محترم دانشکده دامپزشکی که دوران تحصیلم را در کنارشان گذراندم:

مسؤول محترم بخش رایانه: سرکار خانم مهندس رحیمی

مسؤولین محترم بخش کتابخانه: سرکار خانم ایمان طلب و نوربخش

کارشناسان محترم آزمایشگاه:

آقایان هاشمی، پورادیب ، نقره‌ای ، آقایان آذری ، محمدنژاد، عشرتی سرکار خانم مقدم و خواجه‌نصیری

مسؤولین محترم بخش آموزش: آقایان عرفانی و واحدی

کارمندان محترم بخش پژوهشی: سرکار خانم اسماعیل زاده

کارمندان محترم بخشهای مختلف درمانگاه: آقایان رشیدنژاد، محمدزاده، اشجع، صمدی، اکبرنیا، فرهمند، براتی. سماقچه. طهماسبی وغلامی

مسؤول محترم بخش تکثیر: آقای تدین

امور عمومی : آقای رحمانیان

حوزه مدیریت: سرکار خانم جمشیدی

و به یاد :

همکلاسی های عزیزم در ورودی ۸۲ که دوستانه و هم مسیر لحظه های شادی را در کنار یکدیگر خاطره کردیم.

با سپاس فراوان ازدوستانم در خوابگاه:

که لحظات فراموش نشدنی را کنارشان داشتم.

فاطمه، ویدا، سعیده، سیما، مولود، مرضیه و

دوست عزیزم مریم

چکیده

شناسایی ویروس نفریت عفونی به روش RT-PCR در گله‌های مبتلا به جراحات کلیوی

به کوشش

فاطمه صباغ‌زاده فریز

ویروس نفریت عفونی بعنوان یکی از عوامل ایجاد اسهال، تأخیر در رشد، نفریت بینابینی و سندرم سوء جذب در ماکیان گوشتی مطرح می باشد. اهمیت این ویروس به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری کلیوی حاد و واگیر دار به اثبات رسیده است. یافته‌های اخیر اهمیت خسارات اقتصادی ناشی از این ویروس را در نسل نوین سویه‌های تجاری ماکیان گوشتی با قطعیت بیشتری مطرح می‌نماید. در این پژوهش یک تست RT-PCR برای شناسایی ویروس نفریت عفونی پرندگان (Avian Nephritis Virus) در کشور راه اندازی گردید و در همین راستا از چهار گله جوجه گوشتی واقع در شهرستان مشهد، با جراحات کلیوی در هفته اول پرورش، تعداد ۴۸ نمونه مدفوع به صورت تصادفی و نمونه‌هایی از کلیه‌های واجد جراحات جمع آوری ومورد استخراج RNA و تست RT-PCR قرار گرفت. تعداد ۲۱ نمونه مربوط به ۳ گله از نظر ویروس نفریت عفونی ۱ مثبت و نمونه‌های یک گله نیز منفی بود نمونه‌های تکثیر شده جهت تأیید تشخیص و تعیین توالی، توالی یابی گردیدند. بر اساس نتایج حاصله ویروس شناسایی شده به ترتیب در سطح نوکلئوتید به میزان ۸۷/۵ درصد و در سطح اسید آمینه با سویه‌ی رفرانس ویروس نفریت عفونی ۱ دارای ۹۶/۱ درصد همسانی (Identity) و ۹۹/۳ تشابه

(Homology) بودند. در آنالیز فیلوژنیک ویروس شناسایی شده دارای نزدیکی بیشتری با سویه رفرانس در مقایسه با سویه‌های دیگر بود اگرچه سطح واگرایی بالا نبود. این گزارش اولین مورد اثبات حضور ویروس و بیماری نفریت عفونی در گله‌های طیور کشور می‌باشد.

بدیهی است در مطالعات بعدی بایستی امر جداسازی ویروس و بررسی میزان پاتوژنسیته ویروس انجام گردد. با این اطلاعات می توان اهمیت ویروس های شناسایی شده را با دقت بیشتر ارزیابی نمود. این گزارش اولین مورد اثبات حضور ویروس و بیماری نفریت عفونی در گله‌های طیور کشور با علائم نفروز عفونی و تأخیر نسبی در رشد می‌باشد.

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه

مقدمه ۲

فصل دوم: مبانی نظری تحقیق

۲-۱-عفونت‌های آستروویروسی ۵

۲-۱-۱- مقدمه ۵

۲-۱-۲-طبقه بندی آستروویروس‌ها ۶

۲-۱-۳-سبب شناسی عفونت‌های آستروویروسی ۷

۲-۱-۳-۱-ساختار ویریون ۷

۲-۱-۳-۲-ترکیب ویروس ۸

۲-۱-۳-۳-ساختار ژنومی آستروویروس‌ها ۹

۲-۱-۳-۴-ORF1a ۱۲

۲-۱-۳-۵- ORF1b ۱۴

۲-۱-۳-۶- ORF2 ..... ۱۵

۲-۱-۳-۷-پروتئین‌های غیر ساختمانی ۱۸

۲-۱-۳-۸-پروتئین‌های ساختمانی ۲۲

۲-۱-۴-حساسیت ویروس به عوامل شیمیایی و فیزیکی ۲۳

۲-۱-۵-آستروویروس بوقلمون ۲۴

۲-۱-۵-۱-پاتوژنزیز واپی زئوتیولوژی آستروویروس بوقلمون ۲۵

۲-۱-۶-آستروویروس اردک ۲۹

۲-۱-۷-آستروویروس انسانی ۳۰

۲-۱-۸-آستروویروس سایر حیوانات ۳۰

۲-۱-۹-ویروس نفریت عفونی پرندگان ۳۱

۲-۱-۹-۱-مقدمه ۳۱

۲-۱-۹-۲-میزان وقوع و انتشار ۳۶

۲-۱-۹-۳-سبب شناسی نفریت عفونی پرندگان ۳۷

۲-۱-۹-۴-سیستم‌های میزبان آزمایشگاهی ۴۲

محیط کشت سلولی ۴۲

کشت در جنین جوجه ۴۲

۲-۱-۹-۵-بیماریزایی ۴۳
۲-۱-۹-۶- پاتوژنز ۴۳
۲-۱-۹-۷- میزبان‌های طبیعی و تجربی ۴۶
۲-۱-۹-۸- انتقال ۴۶
۲-۱-۹-۹- علائم بالینی ۴۶
۲-۱-۹-۱۰-علائم کالبد گشایی ۴۷
۲-۱-۹-۱۱-جراحات میکروسکوپیک ۴۸
۲-۱-۱۰-روش‌های تشخیص آزمایشگاهی ۵۰
۲-۱-۱۰-۱-جداسازی ویروس با استفاده از محیط کشت ۵۰
۲-۱-۱۰-۲- روش میکروسکوپ الکترونی ۵۲
۲-۱-۱۰-۳-روش ایمنوالکترومیکروسکوپی ۵۳
۲-۱-۱۰-۴-روش آنزیم ایمونواسی برای شناسایی ویروس ۵۳
۲-۱-۱۰-۵-RT-PCR ۵۴
۲-۱-۱۰-۶-روش ایمونوفلورسنت غیر مستقیم ۵۶
۲-۱-۱۰-۷-روشهای سرولوژی ۵۷
تست خنثی سازی سرم ۵۷
تست الایزا ۵۸
۲-۱-۱۱-تشخیص تفریقی ۵۸
۲-۱-۱۲-استراتژیهای مبارزا تی ۶۰

فصل سوم: روش تحقیق

۳-۱- موارد مورد استفاده ۶۳
۳-۲-لوازم و تجهیزات مورد استفاده ۶۳
۳-۳-آماده سازی وسایل ۶۳
۳-۴-روش کار ۶۴
۳-۴-۱- نمونه‌برداری ۶۴
۳-۴-۲- هموژن کردن نمونه های مدفوع و بافت کلیه ۶۵
۳-۴-۳- استخراج RNA نمونه مدفوع و بافت کلیه ۶۵
۳-۴-۴- مرحله‌ی RT (ساخت cDNA) ۶۶
۳-۴-۵-انتخاب پرایمر ۶۸
۳-۴-۶- مراحل انجام PCR ۶۹
۳-۴-۶-۱-تهیه محلول مادر ۶۹

۳-۴-۷- بررسی محصول pcr ۷۰
۳-۴-۷-۱-مراحل تهیه ژل آگاروز ۷۰
۳-۴-۸-خالص سازی محصولات PCR جهت تعیین توالی ۷۱
۳-۴-۸-۱-مراحل انجام کار ۷۲
۳-۴-۹-تعیین توالی ۷۳
۳-۴-۱۰-آنالیز توالی‌های خام ۷۳
۳-۴-۱۱-جستجوی بانک‌های اطلاعات ژنی برای آنالیز توالی‌های حاصله ۷۴
۳-۴-۱۲-آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های حاصله ۷۴

فصل چهارم: نتایج
۴-۱-علائم بالینی و کالبدگشایی ۷۶
۴-۲-نتایج RT-PCR ۷۶
۴-۳-تعیین توالی ۷۸

فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۹۴

منابع ۱۰۶

فهرست تصاویر

تصویر۱-۲) ویریون آستروویروس..... ۷

تصویر۲-۲) میکروسکوپ الکترونی از آستروویروس‌ها..... ۸

تصویر۳-۲) مدل کپسید آستروویروس..... ۹

تصویر ۴-۲) ارگانیزاسیون مقایسه ای ژنوم آستروویروس پرندگان..... ۱۲

تصویر ۵-۲) آنالیز فیلوژنیک ORF1a آستروویروس..... ۱۳

تصویر ۶-۲) آنالیز فیلوژنیک ORF1b آستروویروس..... ۱۴

تصویر۷-۲) آنالیز فیلوژنیک ORF2 آستروویروس..... ۱۶

تصویر ۸-۲) A توالی تغییر چارچوب پیش بینی شده‌ی آستروویروس پرندگانB ساختمان ثانویه RNA آستروویروس پرندگان..... ۲۱

تصویر ۹-۲) ژنوم ویروس نفریت عفونی..... ۴۰

تصویر ۱۰-۲) آنالیز فیلوژنیک ویروس نفریت عفونی..... ۴۰

تصویر ۱۱-۲) کلیه‌ی رنگ پریده، بزرگ و متورم با الگوی توبولار مشخص..... ۴۷

تصویر۱۲-۲) نفریت بینابینی در پارانشیم کلیه..... ۴۸

تصویر ۱۳-۲) تکثیر آستروویروس در جنین جوجه بوقلمون..... ۵۰

تصویر ۱-۴) نتایج حاصل از ژل الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های مدفوع و کلیه..... ۷۶

تصویر۲-۴) نتایج حاصل از ژل الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های مدفوع و کلیه..... ۷۷

تصویر ۳-۴) ژل Low-melting مربوط به نمونه‌های PCR مثبت..... ۷۹

تصویر۴-۴) کروماتوگرام به عنوان نماینده یکی از محصولات PCR ویروس نفریت عفونی ۱ (ANV1) تکثیر شده..... ۷۹

تصویر۵-۴) ردیف نمودن چندگانه توالی پروتئین حاصل از ترجمه توالی نوکلئوتیدی ویروس نفریت عفونی ۱..... ۸۷

تصویر ۶-۴) ردیف نمودن چندگانه توالی پروتئین حاصل از ترجمه توالی نوکلئوتیدی..... ۸۸

تصویر۷-۴) ردیف نمودن چندگانه بخشی از توالی ویروس نفریت عفونی ۱ مشهد- ایران با ناحیه همسنگ چند ویروس نفریت عفونی ۳ ..... ۸۹
تصویر ۸-۴) درخت فیلوژنی امپلیکون بخشی از ناحیه ORF1a..... ۹۰
تصویر ۹-۴) درخت فیلوژنی امپلیکون بخشی از ناحیه ORF1a، ژن مسئول رمزدهی پروتئین غیر ساختاری (NSP) ویروس نفریت عفونی ۱ (ANV1)..... ۹۱
تصویر۱۰-۴) درخت فیلوژنی امپلیکون بخشی از ناحیه ORF1a، ژن مسئول رمزدهی پروتئین غیر ساختاری (NSP) ویروس نفریت عفونی ۱ (ANV1)..... ۹۲
تصویر۱۱-۴) درخت فیلوژنی بخشی از ORF1a آسترووویروس‌های جدید جوجه..... ۹۳

فهرست جداول

جدول۱-۳) اجزاء محلول واکنش RT در حجم ۲۰ µl..... ۶۷
جدول ۲-۳) اجزاء محلول واکنش PCR در حجم ۲۵..... ۶۸
جدول ۳-۳) برنامه چرخه‌ای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۶۹
جدول ۱-۴) مقایسه توالی نوکلئوتیدی و پروتئین حاصله از ترجمه امپلیکون ۶۰۷ جفت باز مربوط به بخشی از ناحیهORF1a ویروس نفریت عفونی پرندگان..... ۸۳
جدول ۲-۴) مقایسه توالی نوکلئوتیدی و پروتئین حاصله از ترجمه بخشی از امپلیکون ۶۰۷ جفت بازی (495 bp) مربوط به بخشی از ناحیه ORF1a..... ۸۴

فصل اول :

مقدمه و هدف

مقدمه

صنعت طیور سهم قابل توجهی در تأمین بخش عظیمی از نیازهای غذایی بشر امروز را بر عهده دارد. کشور ما نیز از این امر مستثنی نیست. گفته می‌شود صنعت طیور بعد از صنعت نفت دومین صنعت می‌باشد صحت این ادعا بر نگارنده روشن نیست اگرچه نمی‌توان گستردگی این صنعت را در کشور کتمان نمود. راندمان بالای تولید، ارزان بودن قیمت تمام شده محصولات طیور و سهولت پرورش سویه‌های تجاری از جمله مزایای این صنعت محسوب می‌شوند.

بیماری‌های ویروسی یکی از عوامل مهم اختلال در تولید صنعت طیور می‌باشند. از مهمترین ویروس‌ها می‌توان به ویروس‌های حلقوی کوچک اشاره کرد. که با کاهش تولید و افزایش مرگ و میر صنعت طیور را متحمل خسارات اقتصادی فراوانی می‌کنند. بنابراین آشنایی با جنبه های مختلف این بیماری از جمله نشانه‌ها، اپیدمیولوژی، پاتوژنزیز و تشخیص این عوامل بیماریزا امری ضروری می‌باشد.

یکی از مهمترین ویروس‌های حلقوی کوچک ویروس نفریت عفونی پرندگان می‌باشد که سبب ایجاد یک بیماری تحت بالینی با واگیری بالا در ماکیان جوان می‌شود که به کلیه‌ها آسیب می‌رساند.

با توجه به رخداد قابل ملاحظه این عفونت به خصوص در نسل جدید ماکیان گوشتی که قابلیت‌های سیستم دفاعی در آن ها کاهش یافته است لزوم پژوهش در این زمینه را بر ما روشن می‌سازد.

با توجه به اینکه جداسازی و شناسایی این ویروس براساس روش‌های مرسوم دشوار می باشد، گزارشات محدودی در خصوص ارتباط این ویروس با مشکلات موجود در مزارع طیور در دسترس می‌باشد.