



دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دوره دکتری عمومی دامپزشکی

عنوان:

بررسی شیوع ویروس رینوتراکئیت در گربه‌های اهواز با استفاده از روش PCR

نگارش:

احمد روحی زاده

استاد راهنمای اول

دکتر رضا آویزه

(دانشیار بخش داخلی دام‌های کوچک، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

استاد راهنمای دوم

دکتر مسعود رضا صیفی آبادشاپوری

(استاد بخش ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

استاد مشاور

دکتر بهمن مصلی نژاد

(استادیار بخش داخلی دام‌های کوچک، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر مسعود قربانپور

استاد داور

(دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر عباس جلو‌دار

استاد داور

(استادیار بخش بیوشیمی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

تیر ماه ۱۳۸۸

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه دوره دکترای عمومی دامپزشکی)

بدین وسیله گواهی می‌شود پایان نامه آقای احمد روحی زاده دانشجوی رشته دکترای عمومی

دامپزشکی به شماره دانشجویی ۸۱۷۹۲۱ تحت عنوان:

بررسی شیوع ویروس رینوتراکئیت در گربه شهر اهواز با استفاده از روش PCR

جهت کسب درجه دکترای عمومی دامپزشکی در تاریخ ۸۸/۴/۲ توسط هیئت داوران مورد ارزشیابی

قرار گرفت و با درجه عالی تصویب گردید.

امضا	مرتبه علمی	۱- اعضاء هیئت داوران:
	دانشیار	الف- استاد راهنمای اول: دکتر رضا آویزه
	استاد	ب- استاد راهنمای دوم: دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری
	استادیار	ج- استاد مشاور: دکتر بهمن مصلی نژاد
	دانشیار	د- داور: دکتر مسعود قربانپور
	استادیار	ه- داور: دکتر عباس جلو دار
	استادیار	و- نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه: دکتر آریا رسولی

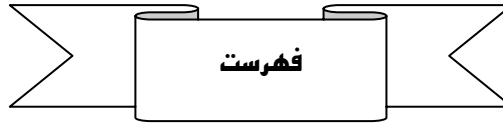
۲- مدیر گروه علوم درمانگاهی: دکتر فریدون صابری افشار دانشیار

۳- معاون پژوهشی و نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده:

دکتر حسین نجف زاده دانشیار

۴- معاون تحصیلات تکمیلی دانشگاه: دکتر عبدالرحیم هوشمند دانشیار

فهرست مطالب



صفحه

عنوان

فصل اول: مقدمه و هدف

مقدمه و هدف ----- ۲

فصل دوم: مروری بر منابع

الف- شناخت کلی گربه ----- ۵

ب- بیماری دستگاه تنفس فوقانی گربه ----- ۶

ب-۱- بیماری رینوتراکئیت عفونی گربه ----- ۷

ب-۱-۱- سبب شناسی ----- ۸

ب-۱-۱-۱- تکثیر ویروس ----- ۹

ب-۱-۲- همه گیر شناسی ----- ۱۱

ب-۱-۳- حاملین ----- ۱۲

ب-۱-۴- انتقال بیماری ----- ۱۵

ب-۱-۵- بیماری زایی ----- ۱۶

ب-۱-۶- نشانه های بالینی ----- ۱۷

ب-۱-۷- تشخیص ----- ۲۱

ب-۱-۸- درمان ----- ۲۵

ب-۱-۹- پیشگیری ----- ۲۶

ب-۱-۱۰- ایمنی ----- ۲۷

ب-۱-۱۱- واکسیناسیون ----- ۲۸

ج- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) ----- ۳۰

ج-۱- تاریخچه ----- ۳۰

-

ج-۲- تعریف ----- ۳۱

-

ج-۳- اساس PCR ----- ۳۲

-

فصل سوم: مواد و روش کار

الف- مواد و وسایل مورد استفاده ----- ۳۷

الف-۱- مواد ----- ۳۷

الف-۲- وسایل ----- ۳۸

-

الف-۳- کیت ----- ۳۸

ب- روش کار ----- ۳۹

ب-۱- حیوانات مورد مطالعه ----- ۳۹

-

ب-۲- نمونه گیری ----- ۴۱

ب-۳- استخراج DNA ----- ۴۱

ب-۴- آزمایش PCR ----- ۴۳

ب-۴-۱- ترکیبات استفاده شده در واکنش PCR ----- ۴۳

ب-۴-۲- برنامه‌ی حرارتی PCR ----- ۴۵

ب-۵- بررسی محصول PCR ----- ۴۶

ب-۵-۱- تهیه ژل آگارز ----- ۴۶

ب-۵-۱-۱- طرز تهیه بافر TAE ----- ۴۶

ب-۵-۲- راه اندازی الکتروفورز ----- ۴۷

ب-۵-۳- تعیین توالی محصول PCR یکی از نمونه‌های مورد آزمایش و مقایسه آن با

توالی ژن تیمیدین کیناز FHV-1 ----- ۴۸

ب-۶- تجزیه و تحلیل آماری ----- ۴۸

فصل چهارم: نتایج

الف- نتایج آزمایش PCR ----- ۵۰

ب- نتایج مقایسه هم ترازوی توالی محصول PCR یکی از نمونه‌ها با توالی ناحیه مربوطه

در ژن TK FHV-1 ----- ۵۱

ج- نتایج آزمایش PCR روی نمونه‌های مورد بررسی ----- ۵۴

د- نتایج بررسی آماری ----- ۵۸

د-۱- نتایج بررسی آماری روی ۳۰ قلاده گربه‌ی خانگی ----- ۵۸

-

د-۲- نتایج بررسی آماری روی ۷۰ قلاده گربه‌ی ولگرد ----- ۵۸

د-۳- نتایج بررسی آماری روی ۱۰۰ قلاده گربه ----- ۵۹

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

الف- بحث ----- ۶۱

الف-۱- بررسی میزان شیوع هرپس و ویروس تیپ ۱ گربه ----- ۶۱

الف-۲- بررسی شیوه‌ی نگهداری ----- ۶۵

الف-۳- بررسی سن ----- ۶۵

الف-۴- بررسی جنس ----- ۶۶

الف-۵- بررسی نژاد ----- ۶۷

-

الف-۶- بررسی نشانه‌ی بالینی ----- ۶۸

الف-۷- بررسی فصل ----- ۶۹

الف-۸- بررسی واکسیناسیون ----- ۷۱

پیشنهادات ----- ۷۲

منابع ----- ۷۴

چکیده انگلیسی ----- ۸۱

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۴۰	جدول ۱-۳- مشخصات ۱۰۰ قلاده گربه‌ی مورد بررسی در این مطالعه -----
۴۹	جدول ۲-۳- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR -----
۵۰	جدول ۳-۳- برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده در PCR -----
	-
۵۵	جدول ۱-۴- توزیع شیوع FHV-1 در ۳۰ قلاده گربه‌ی خانگی شهر اهواز -----
۵۶	جدول ۲-۴- توزیع شیوع FHV-1 در ۷۰ قلاده گربه‌ی ولگرد شهر اهواز -----
	-
۵۷	جدول ۳-۴- توزیع شیوع FHV-1 در ۱۰۰ قلاده گربه‌ی شهر اهواز -----
	-

فهرست اشکال

صفحه	عنوان
------	-------

- شکل ۱-۲- عوامل بیماری‌زای دخیل در بیماری دستگاه تنفس فوقانی گربه ----- ۷
- شکل ۲-۲- شکل شماتیک و تصویر میکروسکوپ الکترونی هرپس ویروس ----- ۹
- شکل ۳-۲- ترشحات چشمی و بینی در گربه مبتلا به رینوتراکئیت عفونی گربه ---- ۲۰
- شکل ۴-۲- زخم روی سطح پشتی زبان در گربه مبتلا به رینوتراکئیت عفونی گربه - ۲۰
- شکل ۵-۲- مراحل واکنش PCR ----- ۳۴
- شکل ۱-۴- نتایج الکتروفورز محصولات PCR گربه‌های مورد آزمایش ----- ۵۰
- شکل ۲-۴- توالی محصول PCR یکی از نمونه‌های اخذشده از گربه‌های مورد
مطالعه ----- ۵۱
- شکل ۳-۴- ردیف نوکلئوتیدی ژن TK ویروس FHV-1 در بانک ژن ----- ۵۲
- شکل ۴-۴- مقایسه توالی محصول PCR با توالی ناحیه مربوطه در ژن TK ----- ۵۳

چکیده‌ی پایان‌نامه

نام خانوادگی: روحی‌زاده	نام: احمد
عنوان پایان‌نامه: بررسی شیوع ویروس رینوتراکیت در گربه‌های اهواز با استفاده از روش PCR	
اساتید راهنما: دکتر رضا آویزه، دکتر مسعود رضا صیفی آبادشاپوری	
درجه تحصیلی: دکتری حرفه‌ای	رشته: دامپزشکی
دانشگاه: شهید چمران اهواز	
دانشکده: دامپزشکی	
تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۸۸/۴/۲	تعداد صفحه: ۸۱
واژه‌های کلیدی: گربه، هرپس‌ویروس تیپ ۱ گربه، PCR، اهواز	
<p>هرپس‌ویروس تیپ ۱ گربه، یکی از عوامل بیماری‌زای بسیار عفونی بخش بالایی دستگاه تنفس در گربه‌های اهلی می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر به‌منظور ارزیابی چگونگی گردش هرپس‌ویروس تیپ ۱ گربه در گربه‌های خانگی و ولگرد شهر اهواز و تعیین میزان شیوع آن، صورت گرفت. سواب‌های حلقی-دهانی، بینی‌ای و چشمی اخذشده از ۱۰۰ قلاده‌گربه (۷۰ قلاده‌گربه ولگرد و ۳۰ قلاده‌گربه خانگی) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) جهت تعیین هرپس‌ویروس تیپ ۱ گربه ارزیابی شدند. تأثیر جنس، سن، فصل، وضعیت نگهداری، واکسیناسیون و نشانه‌های بالینی بر احتمال عفونت، با استفاده از آزمون دقیق فیشر مورد ارزیابی قرار گرفت. حضور هرپس‌ویروس تیپ ۱ گربه در ۲۳ درصد نمونه‌ها ثابت شد. ۱۶/۶ درصد گربه‌های خانگی و ۲۵/۷ درصد گربه‌های ولگرد، از لحاظ ابتلا به هرپس‌ویروس مثبت بودند. ارتباط بین فصل (آب و هوای سرد در برابر گرم) و عفونت و بروز علائم بالینی و عفونت معنی‌دار بود ($P < 0/05$). هیچ اختلاف معنی‌داری بین سن، جنس و وضعیت نگهداری و نیز واکسیناسیون با حضور هرپس‌ویروس تیپ ۱ گربه در گربه‌های مورد بررسی وجود نداشت ($P > 0/05$).</p> <p>این مطالعه نخستین گزارش مبنی بر حضور هرپس‌ویروس تیپ ۱ گربه در گربه‌های ایران است. بنابراین بررسی حاضر نشان می‌دهد که این ویروس در محیط وجود دارد. نرخ شیوع نسبتاً بالای هرپس‌ویروس تیپ ۱ گربه (۲۳ درصد) در گربه‌های شهر اهواز از این فرضیه حمایت می‌کند که احتمالاً به واسطه‌ی تماس مستقیم بین گربه‌ها این ویروس به‌صورت فعال در جمعیت گربه‌ها گردش می‌کند. از آن‌جا که این عفونت ویروسی به آسانی در جمعیت گربه‌ها منتشر می‌گردد، بنابراین اقدامات ویژه برای جلوگیری از عفونت گربه‌های حساس توصیه می‌شود.</p>	

فصل اول

مقدمه و هدف

۸۰ تا ۹۰ درصد موارد عفونت‌های دستگاه تنفس فوقانی گربه‌ها به دو عامل ویروسی هرپس-

ویروس تیپ یک گربه (FHV-1) یا ویروس رینوتراکئیت گربه (FRV) و کلیسی ویروس گربه (FCV) مربوط می‌شود که نشانه‌هایی چون عطسه به همراه درگیری تنفسی، تورم ملتحمه و افزایش ترشحات چشمی، بینی و دهانی از علائم بارز آن‌ها می‌باشد. ویروس رینوتراکئیت گربه در جمعیت گربه‌ها کاملاً گسترده است، اما در حیوانات گروهی نسبت به گربه‌های منفرد شیوع بیشتری دارد. این ویروس به صورت اولیه در ترشحات چشمی، بینی و دهانی گربه‌های آلوده دفع می‌گردد. اصلی‌ترین راه انتقال آن ارتباط مستقیم گربه‌ها با یکدیگر و تماس با ترشحات آلوده می‌باشد (۱۵).

به طور طبیعی عفونت با FHV-1 از راه بینی، دهان و یا ملتحمه ایجاد می‌شود. تکثیر ویروس در مخاطات تیغه‌ی بینی، بوقک‌ها، ناحیه‌ی بینی - حلقی و لوزه‌ها صورت می‌گیرد. ۲۴ ساعت پس از آغاز عفونت با استفاده از سوآب‌های بینی و حلقی - دهانی وجود ویروس را می‌توان شناسایی کرد و این حالت تا ۳-۱ هفته پس از شروع عفونت باقی می‌ماند (۱۵).

تاریخچه‌ی عدم دریافت واکسن به همراه نشانه‌های بالینی به تشخیص بیماری کمک می‌نماید، اما تأیید تشخیص آن نیازمند انجام آزمایشات ویروس‌شناسی می‌باشد (۱۵). معمول‌ترین روش‌های مورد استفاده برای این منظور جداسازی ویروس در کشت سلولی، ایمونوفلئوروسانس مستقیم (IFA) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) می‌باشند. دو روش اول برای تعیین ویروس در طی دوره‌ی حاد بیماری مناسب هستند ولی حساسیت لازم جهت تشخیص بیماری در مرحله‌ی مزمن یا موارد عود مجدد بیماری که میزان دفع ویروس کم می‌باشد، را ندارند. ضمن این‌که آزمایش‌های سرمی، به دلیل وجود پادتن‌های ناشی از انجام واکسیناسیون علیه‌ی بیماری مفید نیستند؛ اما

آزمایش PCR در مقایسه با آزمایشات دیگر از حساسیت بسیار بالاتری برخوردار است و قادر به نشان دادن ویروس در ترشحات گربه‌های مبتلا به عفونت پایدار و بدون علامت بالینی نیز هست (۴۳، ۳۵، ۱۸). در حال حاضر PCR یکی از مهم‌ترین روش‌های تشخیص این بیماری است.

عفونت‌های هرپس ویروسی گربه گسترش جهانی داشته و موارد عفونت به سهولت به کمک روش‌های ملکولی جدید تشخیص داده می‌شوند. متأسفانه تا به حال هیچ‌گونه مطالعه‌ای در خصوص جداسازی و یا به‌طور کلی تشخیص عفونت‌های هرپس ویروسی گربه در ایران گزارش نشده بود. این در حالی است که تاکنون موارد متعددی از گربه‌های مبتلا به درگیری چشم، مجاری فوقانی دستگاه تنفس و نیز زبان به بخش داخلی دام‌های کوچک ارجاع می‌شده است اما عدم وجود روش‌ها و وسایل تشخیصی مناسب مانع از تأیید تشخیص این عفونت‌ها شده است.

هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی حضور عفونت با هرپس ویروس تیپ ۱ گربه در ۱۰۰ قلاده گربه‌ی ولگرد و خانگی شهر اهواز با استفاده از روش PCR می‌باشد که این امر برای اولین بار در ایران صورت گرفته است.

فصل دوم

مروری بر منابع

الف- شناخت کلی گربه

گربه به سلسله‌ی جانوران، شاخه‌ی مهره‌داران، رده‌ی پستانداران، راسته‌ی گوشتخواران، خانواده‌ی گربه‌سانان و جنس گربه تعلق دارد.

گربه‌ها معمولاً وزنی بین ۲/۵ تا ۷ کیلوگرم دارند. اگرچه در بعضی گونه‌های خاص وزن گربه تا ۱۱/۳ کیلوگرم نیز می‌رسد. گربه‌هایی نیز بوده‌اند که به دلیل پرخوری تا ۳۰ کیلوگرم وزن داشته‌اند. گربه‌ی ماده پس از ۶۱ تا ۶۸ روز دوران بارداری (متوسط ۶۳ روز) به‌طور میانگین ۳ تا ۵ نوزاد به‌دنیا می‌آورد. بدن نوزادان از مو پوشیده شده ولی چشم‌ها و گوش‌هایشان بسته می‌باشد. وزن آن‌ها هنگام تولد بین ۹۰ تا ۱۴۰ گرم بوده و اضافه‌وزن طبیعی حدود ۸۰ تا ۱۰۰ گرم در هفته می‌باشد. در هفته‌ی اول زندگی، نوزادان تنها توانایی مکیدن سینه‌ی مادر، خزیدن و میومیوکردن را دارند. در صورتی‌که بچه‌ها به میزان کافی شیر بخورند و جای مناسب و گرم داشته باشند، اغلب ساکت یا خواب هستند. در حدود ده روزگی چشم‌ها باز شده و در حدود ۲۰ روزگی بچه‌ها قادرند با زبان نیز شیر بنوشند. در هفته‌ی چهارم علاوه بر شیر مادر می‌توان به بچه‌ها شیر و غذای نرم کمکی داد. بچه‌گربه‌ها حتماً باید تا ۲- ماهگی شیر بخورند. گربه‌ها حدود ۶-۷ ماهگی بالغ می‌شوند ولی آبستنی در سن کمتر از یک‌سال مناسب نیست زیرا گربه‌ی ماده هنوز جثه‌ی لازم را کسب نکرده است. گربه‌ی ماده تا ۸ سالگی و نر تا ۱۰ سالگی قابلیت جفت‌گیری مناسب دارند. طول عمر گربه‌ی ساکن منزل با شرایط مناسب حدود ۱۲ تا ۱۵ سال است.

ب- بیماری دستگاه تنفس فوقانی گربه^۱

بیماری دستگاه تنفس فوقانی گربه توسط چند عامل بیماری‌زا رخ می‌دهد که از آن جمله می‌توان به هرپس ویروس تیپ ۱ گربه^۲، کلیسی ویروس گربه^۳، بردتلا برونشی‌سپتیکا^۴، یک سویه از کلامیدیا پسیتاسی در گربه^۵، رئوویروس گربه^۶، ویروس آبله‌ی گاوی^۷ و سایر باکتری‌ها و مایکوپلاسماها اشاره نمود (شکل ۱-۲). دو عامل ویروسی هرپس ویروس تیپ ۱ گربه و کلیسی ویروس گربه به‌عنوان مهم‌ترین و اصلی‌ترین عوامل ایجادکننده‌ی بیماری معرفی شده‌اند (۳۹، ۱۵، ۱۶). بیماری نشانه‌های بالینی شدید و حاد در گربه‌های منفرد و گروهی و نیز بیماری مزمن در گربه‌های منفرد را ایجاد می‌کند (۳۹).

^۱ - Feline Upper Respiratory Disease

^۲ - Feline herpesvirus type-1

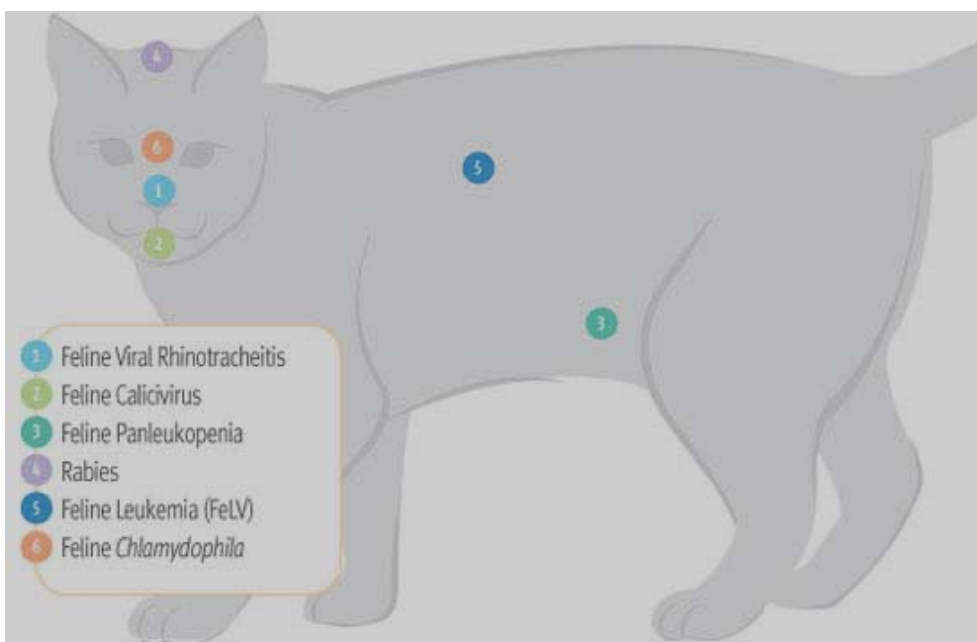
^۳ - Feline Calicivirus

^۴ - *Bordetella bronchiseptica*

^۵ - *Chlamydia psittaci* (var. *felis*)

^۶ - Feline reovirus

^۷ - Cowpox virus



شکل ۲-۱- عوامل بیماری‌زای دخیل در بیماری دستگاه تنفس فوقانی گربه

ب-۱- بیماری رینوتراکئیت عفونی گربه^۸

رینوتراکئیت عفونی گربه که رینوتراکئیت ویروسی گربه^۹ (FVR) نیز گفته می‌شود، یک

عفونت ویروسی در تمام گربه‌سانان است که توسط هرپس ویروس تیپ ۱ گربه (FHV-1) ایجاد می-

گردد. علت ۴۰ تا ۵۰ درصد از موارد بیماری مجاری تنفسی فوقانی گربه را، عفونت با این ویروس

ذکر می‌کنند (۱).

ب-۱-۱- سبب‌شناسی

^۸ - Feline infectious rhinotracheitis disease

^۹ - Feline viral rhinotracheities