دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

عنوان

ارزیابی بالینی، آسیب‌شناختی و هماتولوژیک گاومیش‌های آلوده به ویروس کمبود ایمنی گاو کشتار شده در کشتارگاه صنعتی تبریز

اساتید راهنما

دکتر محمد طلوعی

دکتر جواد اشرفی هلان

اساتید مشاور

دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی

دکتر عزت الله فتحی

پژوهشگر

مرتضی مظفری

مرداد ۹۲

بسم الله الرحمن الرحیم

سوگند نامه بین المللی فارغ التحصیلان دکتری دامپزشکی

باپذیرفته شدن در حرفه دامپزشکی

من باتمام وجود سوگندیاد می کنم که از آگاهی های علمی و

مهارتهایم برای کمک به جامعه از طریق

محافظت از سلامت حیوانات

تسکین درد و آلام آنان

محافظت از منابع دامی

بالابردن بهداشت دامی

وپیشرفت دانش پزشکی استفاده نمایم .

من حرفه ام رابانهایت وجدان و شرافت به کار خواهم گرفت

واصول وآرمان های دامپزشکی را حراست خواهم نمود.

من متعهد می شوم که مادام العمربه طور مستمر در جهت

ارتقاء آگاهی های حرفه ای وصلاحیتم بکوشم .

پروردگارا

به من

آرامش ده

تا بپذیرم آنچه را که نمی‌توانم تغییر دهم

دلیری ده

تا تغییر دهم آنجه را که می‌توانم تغییر دهم

بینش ده

تا تفاوت این دو را بدانم

ومرا فهم ده

تا متوقع نباشم دنیا و مردم آن مطابق میل من رفتار کنند

خدایا

به من زیستی عطا کن که در لحظه‌ی مرگ بر بی‌ثمری لحظه‌ای که برای زیستن گذشته است، حسرت نخورم و مردنی عطا کن که بر بیهودگی‌اش سوگوار نباشم.

تقدیم به:

پدر عزیزم

آن ستاره تابناکی که عظمت وجود پرمهرش همیشه پشتوانه تمام مراحل زندگیم بوده و هر چه دارم ملهم از تجلی آن اسوه استثنائیست، زحمات بی‌دریغ او را می‌ستایم و با نهایت ارادت بر چشمان مهربانش بوسه می‌زنم و آن همه مردانگی و اخلاص او را تقدیس کرده و در برابر این همه بزرگواری تعظیم می‌کنم.

تقدیم به:

مادر مهربان و فداکارم

به الهه صبر و شکیبایی، به عزیزترین گوهر زندگیم، به چشمان همیشه نگرانش، به مادری که لحظه لحظه حیاتم مدیون فداکاری‌های او، بال محبتش سپر ناملایمت‌های زندگیم بوده، سخنان الهام بخشش رهنمون راهم و نسیم محبت مادرانه‌اش همواره نوازشگر وجودم بوده است، اما افسوس که زبانم قاصر از بیان این وجود مقدس است. باشد که این تلاش اندک، قطره‌ای از زحمات بی‌دریغش را جبران نماید.

تقدیر و تشکر صمیمانه از اساتید ارجمند و گرانمایه:

جناب آقای دکتر محمد طلوعی

و

جناب آقای دکتر جواد اشرفی هلان

به خاطر یاری نمودن من در این پایان‌نامه و به خاطر محبت‌هایی که در حق من نموده‌اند.

تقدیر و سپاس از اساتید بزرگوار:

جناب آقای دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی

و

جناب آقای دکتر عزت الله فتحی

به پاس مشاوره و همکاری صمیمانه ایشان در انجام این پایان‌نامه.

با تشکر ویژه از استاد گرانقدر:

جناب آقای دکتر رضی الله جعفری جوزانی

جهت داوری و مطالعه این پایان نامه.

و با سپاس فراوان از دوستان و همکلاسی‌های عزیزم

نام خانوادگی: مظفری نام: مرتضی

عنوان: **ارزیابی بالینی، آسیب‌شناختی و هماتولوژیکی گاومیش‌های آلوده به ویروس کمبود ایمنی گاو کشتار شده در کشتارگاه صنعتی تبریز**

استاد راهنما: دکتر محمد طلوعی، دکتر جواد اشرفی هلان اساتید مشاور: دکتر غلامرضا نیکبخت

بروجنی، دکتر عزت ا... فتحی

مقطع تحصیلی: دکترای حرفه‌ای رشته : دامپزشکی دانشگاه : تبریز

دانشکده: دامپزشکی تاریخ فارغ‌التحصیلی : ۱۳۹۲/۵/۲۹ تعداد صفحات: ۸۱

کلید واژه‌ها: ویروس کمبود ایمنی گاوان، گاومیش، اختلالات بالینی، پاتولوژی، هماتولوژی، تبریز

چکیده: گستردگی جهانی ویروس نقص ایمنی گاوان (BIV) با وجود قدمت کم این ویروس، به اثبات رسیده است که به تبع آن مطالعاتی هرچند اندک در ایران نیز انجام پذیرفته است که حضور این ویروس در برخی از گاوداری های ایران محرز شده است. لذا نظر به تحقیقات اندکی که در گاوهای ایران در مورد ویروس BIV انجام شده و همچنین آلودگی نژاد های بومی و حتی گاومیش های برخی کشورها و عدم وجود هیچ‌گونه اطلاعاتی از میزان شیوع BIV در گاومیش های ایران، این تحقیق برای اولین بار با هدف ارزیابی بالینی، آسیب شناختی و هماتولوژیکی گاومیش های آلوده به BIV کشتار شده در کشتارگاه صنعتی تبریز به اجرا درآمد. بدین منظور طی مراجعه به کشتارگاه، علاوه بر معاینه بالینی گاومیش ها، نمونه‌های بافتی مناسب و خون حاوی ماده ضد انعقاد جهت ردیابی ویروس و همچنین بررسی های آسیب شناسی و هماتولوژیک اخذ گردید. ژنوم حاوی DNA از پلت های تهیه شده از خون کامل به دست آمد و به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمر gag مورد ارزیابی قرار گرفت که در نتیجه آن ۲ مورد از ۸۳ نمونه (۲/۴٪) اخذ شده از نظر آلودگی به BIV مثبت بودند. دام های آلوده به این ویروس اختلالات بالینی نظیر آلودگی انگلی، مشکلات پوستی و دهانی، لاغری و اختلالات اندام های حرکتی داشتند ولی با توجه به تعداد کم نمونه های مثبت، بین میزان آلودگی و اختلالات بالینی از نظر آماری ارتباط معنی داری وجود نداشت. همچنین ضایعات پاتولوژیک مانند پرخونی و ادم متوسط، هیپرپلازی فولیکولار بافت لنفی به همراه مراکز زایگر و حضور تجمعات کانونی سلول های اپیتلیوئید و ماکروفاژ در عقده های لنفاوی پیش کتفی گاومیش های آلوده به این ویروس مشاهده گردید. در این بررسی شمار کل گلبول های سفید و درصد لنفوسیت ها در دام های آلوده به BIV نسبت به دام های غیر آلوده پایین تر و درصد نوتروفیل ها بالاتر بود که البته از نظر آماری این تغییرات معنی دار نبودند. این مطالعه نشان می دهد که میزان آلودگی گاومیش های استان آذربایجان شرقی به ویروس نقص ایمنی گاوان پایین می باشد که این شیوع پایین را می توان این گونه توجیه نمود که گاومیش های این منطقه به صورت کاملا سنتی نگهداری می شوند و مداخلات دامپزشکی نظیر تلقیح مصنوعی، واکسیناسیون و انتقال خون در مورد آن ها به ندرت انجام می پذیرد. از طرفی برای بررسی ارتباط بین آلودگی به BIV و مشکلات بالینی، پاتولوژیک و هماتولوژیک در گاومیش ها نیاز به بررسی های کامل تر با حجم نمونه بسیار بیشتر می باشد.

فهرست مطالب

کلیات و بررسی منابع..... ۱

۱- مقدمه..... ۲

۲- خانواده رتروویروس‌ها..... ۳

۲-۱ خصوصیات رتروویروس‌ها..... ۳

۲-۲ جنس لنتی‌ویروس‌ها..... ۴

۲-۲-۱ ساختار کلی لنتی‌ویروس‌ها..... ۵

۲-۲-۲ ژنوم لنتی‌ویروس‌ها..... ۶

۲-۲-۳ رونویسی لنتی‌ویروس‌ها در سلول میزبان..... ۷

۲-۲-۴ ویژگی‌های معمول لنتی‌ویروس‌ها..... ۸

۳- لنتی‌ویروس‌های آلوده کننده پستانداران..... ۸

۳-۱ ویروس نقص ایمنی انسان..... ۸

۳-۲ ویروس نقص ایمنی میمون..... ۱۰

۳-۳ ویروس نقص ایمنی گربه..... ۱۰

۳-۴ ویروس آنمی عفونی اسبان..... ۱۱

۳-۵ لنتی‌ویروس‌های نشخوارکنندگان کوچک..... ۱۲

۳-۶ لنتی‌ویروس‌های نشخوارکنندگان بزرگ..... ۱۳

۳-۶-۱ ویروس بیماری جمبرانا (JDV)..... ۱۴

۳-۶-۲ ویروس نقص ایمنی گاو (BIV)..... ۱۴

۳-۶-۲-۱ گرایش سلولی..... ۱۵

۳-۶-۲-۲ اختصاصات میزبانی..... ۱۶

۳-۶-۲-۴ بیماریزایی..... ۱۷

۳-۶-۲-۵ پراکندگی و شیوع..... ۱۸

۳-۶-۲-۶ علایم بالینی و اثرات ویروس بر روی سلامت و تولید گله..... ۲۰

۳-۶-۲-۷ کلینیکال پاتولوژی..... ۲۲

۳-۶-۲-۸ یافته‌های کالبدگشایی..... ۲۳

۳-۶-۲-۹ یافته‌های آسیب‌شناسی..... ۲۳

۳-۶-۲-۱۰ روش‌های تشخیص آزمایشگاهی..... ۲۵

۱۱-۲-۶-۳ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۲۷
۳- گونه گاومیش (بوفالو) و پراکندگی آن در ایران و جهان ۳۰
۱-۳ طبقه‌بندی ۳۰
۲-۳ پراکندگی ۳۱
مواد و روش کار ۳۴
۱- تعیین حجم نمونه و روش نمونه‌برداری ۳۵
۲- روش انجام مطالعات آزمایشگاهی ۳۷
۱-۲ مطالعات هماتولوژیک ۳۷
۱-۱-۲ شمارش تعداد گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز ۳۷
۲-۱-۲ شمارش افتراقی گلبول‌های سفید ۳۸
۲-۲ مطالعات پاتولوژی ۳۸
۱-۲-۲ تهیه مقاطع میکروسکوپی جهت مطالعه پاتولوژی ۳۸
۲-۲-۲ رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین ۴۱
۲-۳ مطالعات ویروس شناسی ۴۴
۱-۳-۲ مراحل تهیه پلت ۴۴
۲-۳-۲ استخراج DNA ۴۴
۳-۳-۲ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۴۵
۴-۳-۲ الکتروفورز محصولات PCR ۴۷
۱-۴-۳-۲ بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز ۴۷
۲-۴-۳-۲ تهیه ژل آگارز ۱ درصد و انجام الکتروفورز ۴۸
۵-۳-۲ رنگ‌آمیزی ژل الکتروفورز ۴۹
۶-۳-۲ عکسبرداری از ژل ۵۰
۳- بررسی آماری داده‌ها ۵۰
نتایج ۵۲
۱- دام‌های نمونه‌برداری شده ۵۳
۲- میزان آلودگی به ویروس نقص ایمنی گاوان ۵۴
۳- بررسی رابطه بین آلودگی به ویروس BIV و سن ۵۵
۴- بررسی رابطه بین مشکلات بالینی و کالبدگشایی و آلودگی به ویروس BIV ۵۶

۵- بررسی فاکتورهای هماتولوژیک گاومیش‌های مبتلا به BIV و مقایسه آن با گاومیش‌های غیرآلوده ۵۶
۶- بررسی هیستوپاتولوژیک عقده‌های لنفاوی گاومیش‌های مورد مطالعه ۵۹
بحث و نتیجه‌گیری ۶۴
منابع ۷۳

فهرست تصاویر و جداول

تصویر ۱-۱ نمای شماتیک ویروس نقص ایمنی گاوان ۱۵

تصویر ۲-۱ پراکندگی لنتی‌ویروس‌های نشخوارکنندگان بزرگ در نقاط مختلف جهان..... ۲۰

تصویر ۳-۱ مراحل انجام واکنش PCR ۲۷

جدول شماره ۱-۱ جمعیت گاومیش(رأس) در استان آذربایجان شرقی به تفکیک شهرستان طی سال‌های ۹۱-۱۳۸۹ ..... ۳۳

جدول شماره ۱-۲ پرسشنامه طرح بررسی وضعیت آلودگی ویروس کمبود ایمنی گاومیش‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی تبریز ۳۶

جدول شماره ۲-۲ معیار طبقه بندی شده تخلیه بافت لنفاوی در عقده لنفی ۴۳

جدول شماره ۲-۳ معیار طبقه بندی شده پرخونی در عقده لنفی ۴۳

جدول شماره ۲-۴ معیار طبقه بندی شده هیپرپلازی بافت لنفاوی در عقده لنفی ۴۳

جدول شماره ۲-۵ توالی نوکلئوتیدی و موقعیت پرایمرهای مورد استفاده در آمپلیفیکاسیون قطعه ژن ویروس کمبود ایمنی گاو ۴۶

جدول شماره ۲-۶ غلظت اجزای واکنش PCR ۴۶

جدول شماره ۲-۷ مراحل PCR، دما و مدت زمان آن‌ها ۴۷

جدول ۳-۱ توزیع نمونه‌ها بر اساس سن گاومیش‌های مورد مطالعه ۵۳

جدول ۳-۲ توزیع نمونه‌ها بر اساس جنس گاومیش‌های مورد مطالعه ۵۳

جدول ۳-۳ توزیع علائم بالینی و ضایعات مشاهده شده در گاومیش‌های مورد مطالعه ۵۳

جدول ۳-۴ میزان آلودگی به BIV بر اساس نتایج PCR در ۸۳ راس گاومیش مورد مطالعه ۵۴

تصویر ۳-۱ ژل آگاروز مربوط به الکتروفورز برخی از نمونه‌های محصولات PCR آمپلیفای شده با پرایمر gag ویروس نقص ایمنی گاو ۵۴

نمودار ۳-۱ میزان آلودگی به BIV بر اساس نتایج PCR در ۸۳ راس گاومیش مورد مطالعه ۵۵

جدول ۳-۵ توزیع فراوانی میزان آلودگی به BIV در سنین مختلف ۵۵

جدول ۳-۶ مقایسه میزان مشکلات بالینی و ضایعات کالبدگشایی در گاومیش‌های +BIV و -BIV ۵۶

جدول ۳-۷ مقادیر فاکتورهای هماتولوژیک ۸۳ گاومیش مورد مطالعه ۵۷

نمودار ۳-۲ مقایسه میانگین شمارش کل گلبولهای سفید بین حیوانات +BIV و -BIV ۵۷

نمودار ۳-۳ مقایسه میانگین شمارش تفریقی گلبولهای سفید بین حیوانات +BIV و -BIV ۵۸
نمودار ۳-۴ مقایسه میانگین فاکتورهای گلبول قرمز بین حیوانات +BIV و -BIV ۵۸
تصویر ۳-۲ نمای میکروسکوپیک از عقده لنفی گاومیش ماده با سن کمتر از ۲ سال ۵۹
تصویر ۳-۳ نمای میکروسکوپیک از عقده لنفی گاومیش ماده با سن بیش‌تر از ۵ سال ۵۹
تصویر ۳-۴ نمای میکروسکوپیک از عقده لنفی گاومیش ماده با سن حدود ۳-۴ سال ۶۰
تصویر ۳-۵ نمای میکروسکوپیک از عقده لنفی گاومیش ماده با سن حدود ۳-۴ سال ۶۰
تصویر ۳-۶ نمای میکروسکوپیک از عقده لنفی گاومیش ماده با سن بالاتر از ۵ سال ۶۱
تصویر ۳-۷ نمای میکروسکوپیک از عقده لنفی گاومیش ماده با سن بالاتر از ۵ سال ۶۱
جدول شماره ۳-۸ تغییرات هیستوپاتولوژیک نواحی مختلف عقده لنفی ۶۲
جدول شماره ۳-۹ ضایعات مربوط به عقده لنفی ۶۳

فصل اول:

کلیات و بررسی منابع

۱- مقدمه

ویروس نقص ایمنی گاوان برای اولین بار در سال ۱۹۶۹ طی تحقیقات گسترده‌ای که در مورد ویروس لوسمی گاوان انجام می‌گرفت، در لویزیانای آمریکا جداسازی شد. بدین صورت که از یک گاو شیری ۸ ساله نژاد هلشتاین با علایمی نظیر کاهش پایدار وضعیت بدنی، شمار بالای گلبول‌های سفید خون به طور دایمی و همچنین هیپرپلازی فولیکولی منتشر در عقده‌های لنفاوی به همراه ضایعات دستگاه عصبی مرکزی در بررسی آسیب شناختی، به منظور جداسازی ویروس لوسمی گاوان (BLV) نمونه‌های بافتی اخذ گردید، که طی فرایند جداسازی ویروس، ویروسی مشابه با سایر لنتی‌ویروس‌ها جداسازی شد که R29 نام گرفت [۱]. بعد از بررسی‌های بیشتر به دلیل شباهت‌های بسیار زیاد آن با ویروس ویزنای گوسفند در تشکیل سینسیشیوم سلولی و پاسخ طولانی مدت لنفوسیتی، ویروس شبه ویزنای گاوی نامیده شد. بعد از شناسایی ویروس نقص ایمنی انسان در سال ۱۹۸۳ مطالعه بر روی لنتی‌ویروس‌های حیوانی قوت گرفت و در نهایت با بررسی‌های کامل‌تر برروی R29 و توالی‌یابی آن در سال ۱۹۸۷ و همچنین بررسی دیگر گاوهای آلوده شده به صورت طبیعی و تجربی، به این نتیجه رسیدند که این ویروس عضو مستقلی از خانواده لنتی‌ویروس‌ها می‌باشد و به دلیل قرابت ساختاری، ایمونولوژیکی و ژنتیکی با نقص ایمنی سمیین(SIV)، ویروس نقص ایمنی گربه (FIV) و ویروس نقص ایمنی انسانی تیپ ۱ (HIV-1)، نام ویروس نقص ایمنی گاوان (Bovine Immunodeficiency Virus) را به خود اختصاص داد [۲].

تاکنون بررسی‌های زیادی در مورد رده‌بندی و ساختار ملکولی ویروس، چگونگی انتقال، میزبان‌ها، تشخیص و اپیدمیولوژی و همچنین اثرات آن بر روی میزان سلامت و تولید گله انجام گرفته است، که به طور خلاصه بیان خواهد شد.

۲- خانواده رتروویروس‌ها

در سال ۱۹۰۸ دو دامپزشک به نام الرمن[1] و بنگ[2] در دانمارک و در سال ۱۹۱۱ یک پاتولوژیست به نام روس[3] در امریکا نشان دادند که لوکوز و سارکوم طیور را می‌توان با تلقیح عصاره عاری از سلول بافت‌های توموری طیور بیمار به انواع سالم منتقل کرد. اکنون دریافته‌اند که این دو ویروس وابسته پروتوتیپ عامل ایجاد تومورهای عفونی بدخیم در سایر گونه‌ها مثل گربه، گاو، موش و پریمات‌ها هستند. اکنون این ویروس‌ها را در خانواده بزرگی به نام رتروویریده[4] طبقه‌بندی نموده‌اند که بیشتر ویروس‌های آن از نظر دامپزشکی حائز اهمیت می‌باشند. نام رترو[5] (به معنی معکوس) به لحاظ وجود آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس (DNA پلیمراز وابسته به RNA) در ویریون اعضای این خانواده است.

ویژگی منحصر به فرد خانواده رتروویریده حالت تکرار شونده رونویسی معکوس RNA ویروسی و سپس تشکیل DNA دو رشته‌ای پرووویروس و ادغام آن با ژنوم سلول هدف می‌باشد، که به دلیل این رونویسی معکوس، رتروویروس نامگذاری شده‌اند.

رتروویروس‌ها در ۷ جنس جدا از هم شامل: Lentivirus، Spumavirus، Alpharetrovirus، Betaretrovirus، Gammaretrovirus، Deltaretrovirus و Epsilonretrovirus می‌باشد [۳].

۲-۱ خصوصیات رتروویروس‌ها

رتروویروس‌ها دارای ویریون کروی، غشاءدار، به قطر ۸۰ تا ۱۳۰ نانومتر هستند و پیلومر آن‌ها ۸ نانومتر طول دارد. کپسید آن‌ها ۲۰ وجهی بوده که یک ریبونوکلئوپروتئین مارپیچی در مرکز آن واقع شده است (در مورد لنتی‌ویروس‌ها کپسید مخروطی ناقص است). همه موارد ذکر شده درون غشاء ویروسی قرار گرفته‌اند.

[1] Ellerman
[2] Ban
[3] Rous
[4] Retroviridae
[5] Retro

ژنوم رتروویروس‌ها RNA تک رشته‌ای خطی سنس مثبت می‌باشد که به صورت دو رشته معکوس در درون نوکلئوکپسید قرار گرفته است. اندازه ژنوم Kb ۱۰-۷ بوده و بعضی از آن‌ها ناقص و بعضی ناقل ژن تومورزا هستند. ژنوم رتروویروس‌ها در بین ژنوم سایر ویروس‌ها از جهاتی منحصر به فرد است. اولا تنها ویروس‌هایی هستند که ژنوم آن‌ها دیپلوئید است؛ ثانیا تنها RNA ویروس‌هایی هستند که فرآیند سنتز آن‌ها توسط سیستم mRNA سلول میزبان صورت می‌گیرد، ولی در ژنوم این ویروس‌ها یک tRNA اختصاصی وجود دارد که نقش آن آغاز تکثیر ویروس است. آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس در این ویروس‌ها به عنوان یک DNA پلیمراز وابسته به RNA، یک DNA پلیمراز وابسته به DNA، یک RNA آز و یک اینتگراز نیز عمل می‌کند [۴].

لنتی‌ویروس‌ها و اسپوماویروس‌ها از این نظر که پتانسیل انکوژنتیک ندارند از دیگر جنس‌های رتروویروس متمایزند [۵].

لنتی‌ویروس‌ها به طور گسترده پس از کشف ویروس نقص ایمنی انسان مورد مطالعه قرار گرفتند. کمپبل[1] و رابینسون[2] پیشنهاد کردند که نام ویروس نقص ایمنی گاو حذف و به جای آن لنتی‌ویروس شماره یک گاو استفاده شود.

۲-۲ جنس لنتی‌ویروس‌ها

لنتی‌ویروس‌ها توسط کمپبل و رابینسون (۱۹۹۸) بررسی شده‌اند [۵]. اکثر عفونت‌های لنتی‌ویروسی یک دوره بدون علامت طولانی قبل از بروز علائم بیماری‌های مزمن بالینی همراه با پیشرفت آهسته اما اجتناب ناپذیر از مرگ شناسایی می‌شوند.

جزئیات ساختمان لنتی‌ویروس‌ها با رتروویروس‌ها تا حدی متفاوت است، زیرا آن‌ها واجد چند ناحیه تنظیمی هستند که در سایر رتروویروس‌ها مشاهده نمی‌شوند، مورفولوژی و مورفوژنز آن‌ها نیز با رتروویروس‌ها تفاوت دارد. غشاء پلاسمایی در محل جوانه زدن ویریون آن‌ها خیلی ضخیم می‌گردد، ظهور

[1] Campbell
[2] Robinson