دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

۸۲۷۹۲۱

پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی

عنوان:

« جستجوی آنتی‌ژنیکی ویروس پاراآنفلوآنزا در سگ‌های دارای علائم تنفسی، در شهرستان اهواز»

نگارش

بهاره رامش

اساتید راهنما

دکتر بهمن مصلی نژاد

دکتررضا آویزه

استاد مشاور

دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری

[Type text]

خرداد ۱۳۸۹

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی

عنوان:

‹‹ جستجوی آنتی‌ژنیکی ویروس پاراآنفلوآنزا در سگ‌های دارای علائم تنفسی، در شهرستان اهواز››

نگارش:

بهاره رامش

دکتر بهمن مصلی نژاد
(استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز) **استاد راهنمای اول**

دکتررضا آویزه
(دانشیاردانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز) **استاد راهنمای دوم**

دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری
(استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز) **مشاور**

دکترمسعود قربانپور
(استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز) **داور**

دکتر علیرضا قدردان مشهدی
(دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز) **داور**

دکتر صالح اسماعیل زاده
(دانشیاردانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز) **ناظر تحصیلات تکمیلی**

خرداد ۱۳۸۹

بسم الله الرحمن الرحيم

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دوره دکتری حرفه ای

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه دکترای حرفه ای دامپزشکی)

بدینوسیله گواهی می شود پایان نامه خانم **بهاره رامش** دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی به شماره دانشجویی **۸۲۷۹۲۱** تحت عنوان :

« **جستجوی آنتی‌ژنیکی ویروس پاراآنفلوآنزا در سگ‌های دارای علائم تنفسی، در شهرستان اهواز** »

جهت اخذ درجه دکترای دامپزشکی در تاریخ **۸۹/۳/۱۶** توسط هیات داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با **درجه عالی** تصویب گردید.

۱- اعضاء هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
الف- استاد راهنمای اول: دکتر بهمن مصلی نژاد	استادیار	.....
ب- استاد راهنمای دوم: دکتر رضا آویزه	دانشیار	.....
ج- استاد مشاور: دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری	استاد	.....
د- داور اول: دکتر مسعود قربانپور	استاد	.....
ه- داور دوم: دکترعلیرضا قدردان مشهدی	دانشیار	.....
و- نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه (استاد ناظر) :		
دکتر صالح اسماعیل زاده	دانشیار	.....
۲- مدیر گروه علوم درمانگاهی:		
دکتر علیرضا غدیری	دانشیار	.....
۳- معاون پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشکده :		
دکترسیدرضا فاطمی طباطبایی	استادیار	.....
٤- مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه :		
دکتررحیم پیغان	استاد	.....

با تشکر و سپاس فراوان از سروران گرامی:

- جناب آقای دکتر بهمن مصلی نژاد، استاد راهنمی پایان نامه که افتخار شاگردی ایشان را داشتم و در محضر ایشان صبر و دقت را آموختم.
- جناب آقای دکتر رضا آویزه، که در طول این مطالعه از راهنمایی هایشان بسیار بهره بردم.
- جناب آقای دکتر مسعود رضا صیفی آبادشاپوری، که در انجام این پایان نامه، هیچ گاه از کمک و مساعدت من دریغ ننمودند.
- جناب آقای دکتر علیرضا قدردان مشهدی و جناب آقای دکتر مسعود قربانپور که صمیمانه همکاری کرده و دوداری پایان نامه را بر عهده گرفتند.

و جناب آقای دکتر صالح اسماعیل زاده به خاطر نظارت بر حسن اجرای جلسه دفاعیه پایان نامه.

تشکر فراوان از:

سرکار خانم داغری به پاس زحمات بی دریغ و بی منتش

و همچنین از جناب آقای محمدیان که در انجام این پایان نامه مرا یاری نمودند کمال تشکر را دارم.

تقدیم به پدر و مادر عزیزم :

که موفقیت امروز من حاصل زحمات دیروزشان است

آنانکه همیشه برایم بهترین خواستند و برایم بهترین هستند

تقدیم به همسر عزیزم :

که در کنارش به معنای واقعی صبر، فداکاری و ایثار رسیدم

تقدیم به خواهر و برادر عزیزم :

که وجودشان ترنّم باران بهاری در کویر دلگنگی هایم است

تقدیم به پدر و مادر همسرم :

آنانکه لطف و محبت بی دریغ شان، همواره پشتیبانم بوده است.

تقدیم به همکلاسی های خوب و مهربانم که همیشه یادشان در خاطرم سبز خواهد بود

خانم ها:

پریسا علیزاده نیا، مرضیه ارجمندنژاد، گلناز فرامرزی، مریم رهروانی، فاطمه مجتهدی، معصومه شیخ زاده، نگار کتوندی، اعظم تویسرکانی، مرضیه حیدری، عاطفه اشتری، سارا افتخاریان

آقایان:

امین نیک نژاد و بهنام قربانزاده.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

مقدمه و هدف..... ۲

فصل دوم

مروری بر منابع..... ٤
الف – تراکئوبرونشیت‌عفونی سگ‌ها..... ٥
الف – ۱ – تعریف بیماری..... ٥
الف – ۲ – اتیولوژی..... ٥
الف – ۲ – ۱ – ویروس‌ها..... ٥
الف – ۲ – ۱ – ۱ – ویروس پاراآنفلوآنزای تیپ ۲..... ٥
الف – ۲ – ۱ – ۲ – آدنوویروس تیپ ۲ در سگ‌ها..... ٦
الف – ۲ – ۱ – ۳ – ویروس دیستمپر سگ‌ها..... ٦
الف – ۲ – ۱ –٤ – سایر ویروس‌ها..... ٦
الف – ۲ – ۲ – باکتری‌ها..... ۷
الف – ۲ – ۲ –۱ – باکتری *بوردتلا برونشی سپتیکا*..... ۷
الف – ۲ – ۲ – ۲ – مایکوپلاسماها..... ۷
الف – ۲ – ۲ – ۳ – سایر باکتری‌ها..... ۸
الف – ۳ – اپیدمیولوژی..... ۸
الف – ٤ – انتقال بیماری..... ۱۰

الف – ۵ – علائم بالینی ۱۱
الف – ٦ – گونه‌های حساس ۱۳
الف – ۷ – پاتوژنز ۱۳
الف – ۷ – ۱ – ویروس‌ها ۱۳
الف – ۷ – ۱ – ۱ – ویروس پاراآنفلوآنزای تیپ ۲ ..... ۱۳
الف – ۷ – ۱ – ۲ – آدنوویروس تیپ ۲ ..... ۱٤
الف – ۷ – ۲– باکتری‌ها ۱٤
الف – ۷ – ۲– ۱ – باکتری *بوردتلا برونشی سپتیکا* ۱٤
الف – ۷ – ۲ – ۲ – مایکوپلاسماها ۱٦
الف – ۸ – تشخیص ۱٦
الف – ۸ – ۱ – تشخیص بالینی ۱٦
الف – ۸ – ۲ – معاینه فیزیکی ۱۷
الف – ۸ – ۳ – تغییرات هماتولوژی و بیوشیمیایی خون ۱۷
الف – ۸ – ٤ – کشت باکتریایی ۱۸
الف – ۸ – ۵ – جداسازی ویروس ۱۸
الف – ۸ – ٦ – رادیوگرافی ۱۹
الف – ۸ – ۷ – روش های سرولوژیک ۱۹
الف – ۸ – ۸– Nested-PCR ۲۰
الف – ۸ – ۹– اندازه‌گیری میزان برخی از فاکتورها در مایع بدست آمده از لاواژ برونکوآلوئولار ۲۱
الف – ۸ – ۹– ۱– آلکالین–فسفاتاز و لاکتات–دهیدروژناز ۲۱
الف – ۸ – ۹– ۲– ترومبوکسان B_2 ..... ۲۱
الف – ۹ – درمان ۲۱
الف– ۹ – ۱ – آنتی بیوتیک‌ها ۲۲
الف – ۹ – ۲ – گلوکوکورتیکوئیدها ۲٤
الف – ۹ – ۳ – ضدسرفه‌ها ۲٤

الف – ۹ – ٤– متسع کننده‌های برونش..... ۲۵
الف – ۹ – ۵ – واکسیناسیون داخل بینی..... ۲٦
الف – ۹ – ٦ – خلط آورها..... ۲٦
الف – ۹ – ۷ – داروهای ضدویروسی ۲۷
الف – ۱۰ – پیشگیری ۲۷
الف – ۱۱ – ۱ - ایمنی..... ۲۷
الف – ۱۱ – ۲ - واکسیناسیون..... ۲۸
الف – ۱۱– ۲ – ۱ – واکسن‌های تزریقی و داخل بینی..... ۲۸
الف – ۱۱ – ۲– ۲ – عوارض جانبی واکسیناسیون..... ۳۱
الف – ۱۲ – مدیریت همه گیری بیماری..... ۳۲
الف – ۱۲ – ۱ – جداسازی سگ‌های بیمار و ضد عفونی کردن محل زندگی..... ۳۲
الف – ۱۲ – ۲ – تهویه و دمای مناسب..... ۳۳
ب – سایر عوامل ویروسی ایجاد کننده بیماری‌های تنفسی در سگ ۳۳
ب – ۱ – آدنوویروس‌ها ۳۳
ب – ۱ – ۱ – شکل کبدی در سگ..... ۳۳
ب – ۱ – ۲ – شکل تنفسی ۳٤
ب – ۲ – دیستمپر (بیماری سگ‌های جوان) ۳٤
ب – ۲ – ۱ - اتیولوژی ۳٤
ب – ۲– ۲ – اشکال بیماری..... ۳۵
ب – ۲– ۳ – علائم بالینی ۳۵
ب – ۳– آنفلوآنزا..... ۳٦
ب – ۳– ۱ – آنفلوآنزای انسانی..... ۳٦
ب – ۳– ۲ – آنفلوآنزای سگ و گربه..... ۳٦
ب – ۳– ۳ – آنفلوآنزای پرندگان..... ۳۷
ج – آلودگی به ویروس پاراآنفلوآنزای غیر تنفسی در سگ‌ها ۳۸
ج – ۱ – علائم بالینی..... ۳۸

فصل سوم

مواد و روش کار..... ٤٠
الف – وسایل و مواد لازم..... ٤١
ب – حیوانات مورد مطالعه..... ٤٢
ج – فرم ثبت اطلاعات..... ٤٣
د – کیت ایمونوکروماتوگرافی ویروس پاراآنفلوآنزا..... ٤٥
د – ١ – روش نمونه‌گیری، آماده‌سازی و انجام آزمایش..... ٤٥
د – ٢ – تفسیرآزمایش..... ٤٦
ه – جداسازی ویروس در کشت سلول..... ٤٧
ه – ١ – نحوه جمع‌آوری نمونه..... ٤٧
ه – ٢ – طرز تهیه محلول PBS (بافرنمکی فسفات)..... ٤٨
ه – ٣ – طرز تهیه محیط کشت سلولی..... ٤٨
ه – ٤ – طرز تهیه محلول تریپسین-EDTA ١٠..... ٤٨
ه – ٥– نگهداری و تجدید کشت سلول‌های MDCK..... ٤٩
ه – ٦ – جداسازی..... ٥٠
و – بررسی‌های آماری..... ٥٢

فصل چهارم

نتایج..... ٥٣
الف – نتایج حاصل از بررسی نمونه‌ها با استفاده از کیت ایمنوکروماتوگرافی..... ٥٤
الف – ١ – فراوانی سگ‌های آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا در سطح شهرستان اهواز..... ٥٤
الف – ٢ – فراوانی سگ‌های آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس نژاد..... ٥٤
الف – ٣ – فراوانی سگ‌های آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس جنس..... ٥٥

الف – ٤ – فراوانی سگ‌های آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس سن ٥٦
الف – ٥ – فراوانی سگ های آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس وضعیت محیط نگهداری٥٧
الف – ٦– فراوانی سگ‌های آلوده به ویروس پاراآنفلوانزا بر اساس شدت علائم بالینی ٥٨
ب – نتایج حاصل از جداسازی ویروس در سلول‌های کلیه سگ (MDCK).....٥٩

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری.....٦٠
الف – تکنیک‌های مورد استفاده به منظور تشخیص ویروس پاراآنفلوآنزا ٦١
ب – بررسی میزان شیوع آلودگی به ویروس پاراآنفلوآنزا.....٦٢
ج – بررسی فاکتور نژاد در سگ‌های مبتلا به ویروس پاراآنفلوآنزا.....٦٦
د – بررسی فاکتور جنس در سگ‌های مبتلا به ویروس پاراآنفلوآنزا.....٦٦
ه – بررسی فاکتور سن در سگ‌های مبتلا به ویروس پاراآنفلوآنزا.....٦٦
و – بررسی وضعیت نگهداری در سگ های مبتلا به ویروس پاراآنفلوآنزا.....٦٧
پیشنهادات.....٦٨
منابع.....٦٩
چکیده انگلیسی ٧٦

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ٤-١- فراوانی سگ‌های شهری آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس نـــژاد در سطح شهرستان اهواز..... ٥٤

جدول ٤-٢- فراوانی سگ‌های روستایی آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس جنس در سطح شهرستان اهواز..... ٥٥

جدول ٤-٣- فراوانی سگ‌های شهری آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس جنس در سطح شهرستان اهواز..... ٥٥

جدول ٤-٤- فراوانی سگ‌های روستایی آلوده به ویروس پاراآنفلوانزا بر اساس سـن در سطح شهرستان اهواز ٥٦

جدول ٤-٥- فراوانی سگ‌های شهری آلوده به ویـروس پاراآنفلـوانزا بر اساس سـن در سطح شهرستان اهواز..... ٥٦

جدول ٤-٦- فراوانی سگ‌های روستای آلوده به ویـــروس پاراآنفلوآنزا بر اساس وضعیت محیط نگهداری در سطح شهرستان اهواز ٥٧

جدول ٤-٧- فراوانی سگ‌های شهری آلـــوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس وضعیت محیط نگهداری در سطح شهرستان اهواز ٥٧

جدول ٤-٨- فراوانی سگ‌های آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا بر اساس شدت علائم بالینی در سطح شهرستان اهواز..... ٥٨

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر ۳-۱- نتیجه منفی کیت ٤٦
تصویر ۳-۲- نتیجه مثبت پاراآنفلوآنزا.....٤٧

چکیده پایان‌نامه

نام خانوادگی: رامش **نام:** بهاره

عنوان پایان‌نامه: جستجوی آنتی‌ژنیکی ویروس پاراآنفلوآنزا در سگ‌های دارای علائم تنفسی، در شهرستان اهواز

استاد راهنما: دکتر بهمن مصلی نژاد، دکتر رضا آویزه

درجه تحصیلی: دکتری عمومی **رشته:** دامپزشکی **گرایش:** دامپزشکی

دانشگاه: شهید چمران اهواز

دانشکده: دامپزشکی

تاریخ فارغ‌التحصیلی: ۱۳۸۹/۳/۱۶ **تعداد صفحه:** ۷۶

کلید واژه‌ها: ویروس پاراآنفلوآنزا، ایمونوکروماتوگرافی، جداسازی ویروس، سگ، اهواز

مطالعه اخیر جهت تعیین شیوع عفونت ناشی از ویروس پاراآنفلوآنزا، در سگ‌های شهری و روستایی منطقه اهواز، انجام شده بود. سگ‌هایی شهری از بین سگ‌های ارجاعی (خانگی) به بیمارستان دامپزشکی دانشگاه اهواز و سگ‌های روستایی از روستاهای اطراف انتخاب شده بودند. نمونه ها از ترشحات تنفسی ۱۷۲ سگ مبتلا به بیماری تنفسی، در فاصله خرداد ماه ۱۳۸۷ تا مهر ماه ۱۳۸۸ بدست آمدند. سگ‌های مورد مطالعه به دو گروه سنی (کمتر و بیشتر از ٦ ماه) و بر اساس محیط نگهداری نیز به دو گروه (باز و بسته) تقسیم‌بندی شدند. نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون مربع کای و آزمون دقیق فیشر مورد آنالیز قرار گرفتند. میزان شیوع عفونت ناشی از ویروس پاراآنفلوآنزا در سگ‌ها ٦/٩٧ درصد، با استفاده از روش ایمونوکروماتوگرافی بدست آمد. عفونت شیوع بیشتری در سگ‌هایی که دسترسی به محیط باز داشتند (۱۷/٥٤ درصد)، در مقایسه با محیط بسته (۱/۷۳ درصد)، دارا بود و تفاوت بین ۲ گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). شیوع عفونت در سگ‌های کمتر از ٦ ماه (۸/۳۳ درصد)، در مقایسه با سگ‌های بالاتر از ٦ ماه (٥/٢٦ درصد)، بیشتر بود، اما تفاوت از نظر آماری بین ۲ گروه معنی‌دار نبود ($P> ۰/۰۵$). میزان عفونت در جنس نر٦/٩٧ درصد و در جنس ماده نیز به همین شکل بود. میزان شیوع عفونت در سگ‌های نژاد مخلوط ۷/۷۵ درصد، در ژرمن شفرد ٥/٥٥ درصد و در دوبرمن پینچر ۱۱/۱۱ درصد بود. هیچ گونه تفاوت معنی‌داری نیز بین جنس و نژادهای مختلف دیده نشد ($P> ۰/۰۵$). جداسازی ویروس از ٥٠ نمونه (۱۲ نمونه مثبت و ۳۸ نمونه منفی) در سلو ل‌های کلیه سگ، انجام شد. اما تمامی نمونه‌ها، آثار تخریب سلولی را در سلول-های مورد نظر ایجاد نکردند. این مطالعه نشان داد که ویروس پاراآنفلوآنزا می‌تواند به عنوان یک فاکتور خطر، به ویژه برای سگ‌هایی که در تماس با یکدیگر هستند در محیط باز و کنل (لانه سگ) مطرح باشد.

مقدمه و هدف

تراکئوبرونشیت‌عفونی[1] سگ‌ها (کنل‌کاف[2] یا سرفه در لانه) یک بیماری تنفسی حاد و مسری است که به صورت ناگهانی همراه با سرفه‌های خشک و مقاوم، اوغ زدن و ترشحات سروزی از چشم و بینی مشخص می‌گردد. از مهمترین عوامل بیماری‌زا در ایجاد کنل‌کاف، می توان باکتری *بوردتلابرونشی‌سپتیکا*[3] (یک کوکوباسیل گرم منفی)، ویروس پاراآنفلوآنزا تیپ۲ [4] (CPiV-2) و آدنوویروس تیپ۲ [5] را نام برد. بنابراین یکی از عوامل بسیار مهمی که در ایجاد کنل‌کاف نقش دارد، پاراآنفلوآنزا می‌باشد. برای سالیان سال ویروس پاراآنفلوآنزا به‌عنوان مهمترین ویروس جدا شده از مجرای تنفسی سگ‌های مبتلا به کنل‌کاف گزارش می‌گردید و به همین منظور، سگ‌ها با استفاده از واکسن‌های ۷ گانه (DHPPiL-R) بر علیه دیستمپر، آدنوویروس، پاروویروس، پاراآنفلوآنزا، لپتوسپیروز و هاری ایمن می‌شوند (۳۹، ٤٠). ویروس پاراآنفلوآنزا برای اولین بار توسط بین[6] و همکاران (۱۹٦۷) از سگ‌های آزمایشگاهی مبتلا به بیماری‌های تنفسی جدا گردید (۹). به دنبال آن دیگر محققین نظیر کراندل[7] (۱۹٦۸)، کرن ول[8] (۱۹۷٦)، کندیش[9] (۱۹۷۸) و آجیکی[10] (۱۹۸۲) گزارشاتی در زمینه ویروس پاراآنفلوآنزا ارائه کردند (٤، ۱۵، ۱۸ و ۳٦). تاکنون روش‌های آزمایشگاهی مختلفی نظیر PCR، ELISA، HA، HI و جداسازی ویروس جهت شناسایی ویروس پاراآنفلوآنزا طراحی شده‌اند که اگر چه اغلب روش‌های فوق از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار هستند ولی به دلیل هزینه‌های بالا، وقت‌گیر بودن و یا نیاز به تجهیزات و نیروی متخصص، کمتر کاربرد دارند. در این میان روش ایمونوکروماتوگرافی، ساده‌ترین و در عین حال

1-Infection tracheobronchitis
2- Kennel cough
3-*Bordotella bronchiseptica*
4-Parainfluenza type 2
5-Adenovirus type 2
6-Binn
7-Crandell
8-Cornwell
9-Candish
10-Ajiki

کاربردی‌ترین روش تشخیصی می‌باشد. کیت‌های ایمونوکروماتوگرافی با ردیابی آنتی‌ژن‌های ویروس قادر به تشخیص کیفی پاراآنفلوآنزا تیپ ۲ بوده و دارای ویژگی[1] ۹۵/۸ درصد و حساسیت[2] ۱۰۰ درصد می‌باشند (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده).

بسته به جمعیت مورد مطالعه، روش‌های مختلف آزمایشگاهی و طرح مساله، شیوع بیماری در بررسی‌های مختلف تا حد زیادی، متفاوت بوده است. نتایج مطالعات بعمل آمده بر روی این ویروس نشان می‌دهد، که شیوع عفونت نه تنها در بین کشورها، بلکه در مناطق مختلف هر کشور نیز ممکن است متفاوت باشد (۴۳، ٤٦). از آنجا که موارد متعددی از سگ‌های بیمار با علائم تنفسی به بخش داخلی دامهای کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ارجاع داده می‌شوند و اطلاعات مشخصی از آلودگی به ویروس پاراآنفلوآنزا در سگ‌های شهری و روستایی شهرستان اهواز در دسترس نمی‌باشد، لذا به منظور ارزیابی اولیه از میزان شیوع آلودگی با این ویروس در سگ‌های مبتلا به بیماری تنفسی در منطقه اهواز، این مطالعه با استفاده از روش‌های ایمونوکروماتوگرافی و جداسازی ویروس طراحی و اجرا گردید. مطالعه اخیر اولین بررسی شیوع عفونت پاراآنفلوآنزا در جمعیت سگ‌های ایران نیز به شمار می‌رود.

1! Specificity
!2! Sensitivity

مروری بر منابع