بررسی آدنوکارسینوم ریوی در گوسفندان مبتلا به بیماری‌های تنفسی مزمن با استفاده از روش Real-time PCR

علی‌اصغر بهاری[1*]، مسعود صبوری‌قناد[2]، امید دزفولیان[3]، علی صادقی‌نسب[4] و فریدون رضازاده[5]

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۴

چکیده

آدنوکارسینوم ریوی گوسفند بیماری تنفسی مزمن با دوره‌ی کمون طولانی است که در اثر رتروویروس جاگزیکت ایجاد می‌شود. در پژوهش حاضر Real-time PCR به عنوان یک روش اختصاصی فوق‌العاده حساس برای شناسایی DNA پروویروسی این رتروویروس در نمونه‌های خون کامل گوسفندان به ظاهر سالم و مبتلا به بیماری‌های تنفسی مزمن در یک بررسی کشتارگاهی ارزیابی شد. هشتاد رأس گوسفند مبتلا به پنومونی مزمن و بیست رأس گوسفند سالم خون‌گیری شدند. پس از کشتار، ریه‌ها بازرسی و از ده منطقه‌ی مشخص نمونه‌های بافتی و عقده‌ی لنفاوی مدیاستینال خلفی برداشت شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. از DNA استخراج شده برای شناسایی DNA پروویروسی رتروویروس جاگزیکت با روش Real-time PCR استفاده شد. تعداد ۱۵ نمونه از ۸۰ نمونه (۱۸/۷۵ درصد) مربوط به گوسفندان مبتلا به پنومونی مزمن و تعداد ۳ نمونه از ۲۰ نمونه (۱۵ درصد) مربوط به گوسفندان به ظاهر سالم، آلوده به DNA پروویروسی رتروویروس جاگزیکت بودند. به علاوه، تعداد ۱۱ نمونه از ۸۰ نمونه (۱۳/۷۵ درصد) مربوط به گوسفندان مبتلا به پنومونی مزمن و تعداد ۲ نمونه از ۲۰ نمونه (۱۰ درصد) مربوط به گوسفندان به ظاهر سالم دارای آلودگی DNA پروویروسی، در آزمایش هیستوپاتولوژی نیز مثبت بودند. آزمون مربع کای ارتباط معنی‌داری را بین وضعیت سلامتی و هیچ یک از آزمایش‌های Real-time PCR (P=۰/۶۹) و هیستوپاتولوژی (P=۰/۶۶) نشان نداد. هرچند این آزمون ارتباط معنی‌داری بین نتایج آزمایش‌های Real-time PCR و هیستوپاتولوژی نشان داد (P≤۰/۰۱). مطالعه‌ی حاضر تایید می‌نماید که Real-time PCR آزمایشی حساس و اختصاصی برای شناسایی آلودگی با ویروس جاگزیکت در گوسفندان به ظاهر سالم و مبتلا به پنومونی مزمن است.

کلمات کلیدی: آدنوکارسینوم، رتروویروس، گوسفند، Real-time PCR و هیستوپاتولوژی

مقدمه

آدنوکارسینوم ریوی گوسفند که در گذشته آدنوماتوز ریوی خوانده می‌شد یک بیماری مزمن تنفسی دارای دوره‌ی کمون و سیر طولانی می‌باشد که اولین بار توسط Robrtson در سال ۱۹۰۴ و پس از آن Mitchel در سال ۱۹۱۵ در آفریقای جنوبی تحت عنوان جاگزیکت[1] توصیف شد. جاگزیکت که در بسیاری از کشورهای جهان شناخته شده ویژه‌ی گوسفند است و بیش‌تر در گوسفندان مسن که بیش‌تر از سه سال دارند، دیده می‌شود (Sharp and De Martini 2003). اولین گزارش این بیماری در ایران بر اساس مشاهده‌ی ضایعات

[1*] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان E-mail: aliasghar.bahari@basu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[2] دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

[3] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

[4] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[5] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز

1- Jaagsiekte

هیستوپاتولوژیک در سال ۱۳۴۲ انجام شد (نقشینه و سهرابی حقدوست ۱۳۴۲) . این بیماری در سایر نشخوارکنندگان اهلی مانند گاو و بز بندرت دیده می‌شود. در میان نژادهای گوسفند نیز برخی نژادها مانند مرینوس نسبت به این بیماری مقاومت بیش‌تری دارند (Sharp and De Martini 2003).

آدنوکارسینوم ریوی توسط یک بتارتروویروس به نام ویروس جاگزیکت گوسفندی ایجاد می‌شود و قابل انتقال در بین گوسفندان است (Palmarini et al. 1999, York et al. 1992). روش مرسوم تشخیص بیماری، مشاهده ضایعات نئوپلاستیک در هیستوپاتولوژی ریه‌ها است و هنگامی به کار برده می‌شود که دام نشانه‌های بالینی بیماری را نشان دهد و قبل از بروز نشانه‌های درمانگاهی این روش تشخیصی کاربرد ندارد (Sharp and Herring 1983, Griffiths et al. 2010). شاخص‌ترین نشانه درمانگاهی این بیماری، تولید بیش از اندازه‌ی مایعات در ریه‌ها است که با رشد تومور بیش‌تر می‌شود و در تنفس دام ایجاد اشکال می‌کند. از آزمایش چرخ دستی[1] یا فرغون برای مشخص کردن مایعات تولید شده اضافی در ریه‌ها می‌توان استفاده کرد (Griffiths et al. 2010). هیچ درمان یا واکسیناسیونی برای مقابله با آلودگی رتروویروس جاگزیکت در دسترس نیست و بیماری آدنوکارسینومای ریوی منجر به مرگ دام می‌شود. آدنوکارسینومای ریوی گوسفند در گله‌های درگیر می‌تواند موجب زیان‌های قابل توجهی شود. بنابراین، به منظور جلوگیری از گسترش عفونت JSRV، یک آزمون تشخیصی قابل اعتماد برای تشخیص گوسفندان آلوده مورد نیاز است (Lewis et al. 2011). از آنجایی‌که ویروس جاگزیکت پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی در حیوانات آلوده القاء نمی‌کند، آزمایش سرولوژیکی دقیق کم هزینه‌ای برای تشخیص عفونت ناشی از این ویروس وجود ندارد و تشخیص آدنوکارسینومای ریوی گوسفند از روی نشانه‌های بالینی و پس از مرگ صورت می‌پذیرد (Garcia-Goti et al. 2000). با این حال، دیگر روش‌های تشخیصی مانند رادیوگرافی قفسه‌ی سینه (Gonzales et al. 2001)، سونوگرافی (Grego et al. 2008) و بررسی هیستوپاتولوژی بیوپسی ریه (Griffiths et al. 2010, Hoffmann et al. 2009) وجود دارد. این روش‌ها فاقد حساسیت کافی و یا ویژگی برای تشخیص این عفونت ویروسی به ویژه در مراحل اولیه‌ی بیماری هستند. با این وجود، یک روش PCR ویژه برای تشخیص DNA پرووویروسی ویروس جاگزیکت در بافت سیستم لنفاوی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی توسعه یافته است (Hunter and Munro 1983). روش PCR اصلاح شده توانسته DNA پرووویروسی ویروس جاگزیکت گوسفند را پیش از شروع تشکیل تومور در بره‌هایی که به صورت تجربی تلقیح شده بودند (De las Heras et al. 2005) و در دوره‌ی پیش از ظهور نشانه‌های بالینی بیماری در گله‌هایی که به صورت طبیعی مبتلا شده بودند (Khodakaram-tafti et al. 2009)، نشان دهد.

Kycko و Reichert در سال ۲۰۱۰ گزارش نمودند که Real-time PCR جایگزین مناسبی برای روش‌های معمول PCR و hemi-nested PCR در تشخیص رتروویروس جاگزیکت می‌باشد و جدای از آزمایش‌های هیستوپاتولوژی و ایمینوهیستوشیمی، می‌تواند به عنوان یک آزمون تاییدی در موارد بالینی مشکوک مورد استفاده قرار گیرد یا به عنوان یک روش غربال‌گری در کنترل و یا ریشه‌کنی این بیماری به کار گرفته شود. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی حضور DNA پرووویروسی رتروویروس جاگزیکت در نمونه‌ی خون گوسفندان مبتلا به پنومونی و گوسفندان به ظاهر سالم با استفاده از روش Real-time PCR به عنوان یک روش با حساسیت بالا و مقایسه‌ی آن با نتایج هیستوپاتولوژی، انجام شد.

1- Wheel barrow

مواد و روش کار

تعداد یک صد رأس گوسفند (هشتاد رأس دارای نشانه‌های بالینی پنومونی مزمن و بیست رأس به ظاهر سالم) از هر دو جنس نر و ماده و از سنین مختلف طی بیست بار مراجعه به کشتارگاه صنعتی همدان به شکل تصادفی انتخاب و نمونه‌گیری شدند. پس از مشاهده از نزدیک، معاینه کلاسیک دستگاه تنفس و سپس آزمایش چرخ‌دستی انجام شد. بر اساس وسعت و شدت صداهای غیرطبیعی ریوی، صدای خشن قسمت‌های بالایی دستگاه تنفسی، ریزش ترشحات بینی و عدم وجود تب، احتمال مزمن بودن درگیری تنفسی داده شد. پیش از کشتار، نمونه‌ی خون توسط لوله‌های ونوجکت دارای ماده‌ی ضدانعقاد EDTA اخذ و پس از شماره‌گذاری، با دنبال کردن لاشه‌ی گوسفندان خون‌گیری شده روی خط کشتار ریه‌ی آن‌ها برداشت شد. نمونه‌های خون کامل تا زمان استخراج ژنوم و آزمایش Real-time PCR در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند. از ریه‌ها، از ده محدوده‌ی ثابت نمونه برداشت شد و در ظرف پلاستیکی درپیچ‌دار حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفت. به علاوه، از عقده‌ی لنفاوی مدیاستینال خلفی نیز نمونه‌برداری شد.

برای تهیه‌ی لام‌های میکروسکوپی از نمونه‌های ریه و عقده‌های لنفاوی مدیاستینال خلفی پس از پایدار شدن در فرمالین بافر ۱۰ درصد و انجام مراحل آماده‌سازی بافتی، برش‌هایی به قطر ۵-۴ میکرومتر تهیه گردید. لام‌های آماده شده با روش هماتوکسیلین- ائوزین هاریس رنگ‌آمیزی شدند.

این واکنش با استفاده از کیت QuantiTect Probe PCR (Qiagen، آلمان) برای ژن مورد نظر انجام شد. استخراج DNA، پرایمرها و پروب مورد استفاده و مراحل آزمایش به شرح زیر بودند.

استخراج DNA از نمونه‌های خون توسط کیت AccuPrep® Genomic DNA Extraction (ساخت Bioneer، کره جنوبی) با استفاده از دستورالعمل کیت انجام شد. برای این واکنش، از پرایمرهای پیشنهادی Palmarini و همکاران در سال ۲۰۰۰ و پروب پیشنهادی Kycko و Reichert در سال ۲۰۱۰ استفاده شد. الیگونوکلئوتیدهای مورد نظر توسط شرکت تکاپو زیست سنتز شدند. توالی پرایمرها و پروب مورد استفاده به صورت زیر بود:

P1: 5'-TGG GAG CTC TTT GGC AGA AGC C-3'
P3: 5'- CAC CGG ATT CTT ACA CAA TCA CCG G-3'
Probe: 5'-FAM-AGC TCC CTG TCC CGC CAC CCT C-3' BHQ1

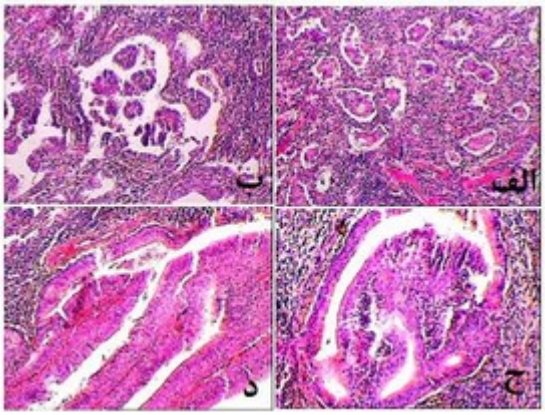
برای واکنش Real-time PCR از هریک از پرایمرهای P1 و P3 به میزان ۰/۹ میکرومول به اضافه ۰/۲ میکرومول پراب و ۰/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده نمونه، به مخلوط آماده‌ی کیت اضافه شد به نحوی که حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود (Kycko and Reichert 2010). روند تکثیر و تزاید DNA نمونه به وسیله‌ی دستگاه ترموسیکلر CFX 96 (ساخت Bio Rad، آمریکا) به شرح ذیل انجام شد:

برای دناتوره کردن اولیه، ابتدا محلول در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه (یک چرخه) قرار گرفت و در نهایت محلول در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (۴۵ چرخه) قرار گرفت. تجزیه و تحلیل واکنش با استفاده از نرم افزار دستگاه (نرم افزار مدیریت CFX) انجام شد. به علاوه، از پلاسمید pJS21-VR3-U3 حاوی توالی نوکلئوتیدی ۵۳۵۰ تا ۷۳۸۳ ژنوم ویروس جاگزیکت (AF105220 Genbank) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

نتایج به دست آمده از آزمایش Real-time PCR و هیستوپاتولوژی در بین گوسفندان مبتلا به پنومونی و گوسفندان به ظاهر سالم به وسیله‌ی آزمون آماری مربع کای مقایسه شدند. آزمون آماری با استفاده از نرم افزار SAS ویرایش ۹/۱ انجام شد.

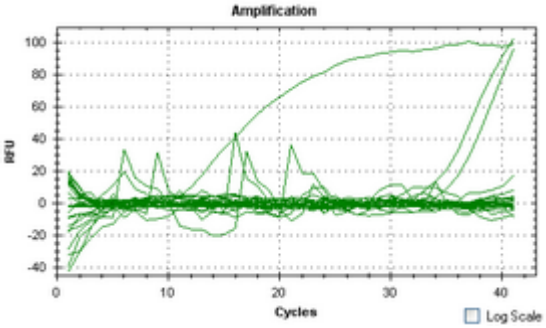
نتایج

نمونه‌های ریه مربوط به تعداد ۱۳ گوسفند، ضایعات و تغییرات میکروسکوپی بیماری آدنوکارسینومای ریوی گوسفند (۱۱ نمونه مربوط به مبتلایان به پنومونی با فراوانی ۱۳/۷۵ درصد و ۲ نمونه مربوط به گوسفندان به ظاهر سالم با فراوانی ۱۰ درصد) را نشان دادند. الگوی غالب رشد تومورها، آسینار (آلوئولار) بود و با وسعت کم‌تر، دیگر اشکال مانند پاپیلاری، آدنوماتوزی، برونشیولار یا ترکیبی از آن‌ها قابل تشخیص بودند (تصویر ۱).



تصویر ۱: الف) الگوی آلوئولی آدنوکارسینوم ریه به صورت آسینار و مقادیر فراوان سلول‌های آماسی و افزایش بافت همبند بینابینی، ب) الگوی آلوئولوپاپیلاری که سلول‌های توموری به صورت آسینی در مرکز حفره و یا به صورت پردی شکل قابل مشاهده هستند، ج) الگوی برونشیوآلوئولار که سلول‌های توموری استوانه‌ای شکل از برونش و آلوئول سرچشمه گرفته و در اطراف آن سلول‌های آماسی تک هسته‌ای و مقادیر کم‌تر چرکی مستقر هستند، د) الگوی برونشیولار که در آن سلول‌های بسیار کشیده توموری به حالت پشت به پشت با غشای پایه و بافت همبند ظریف مشترک و به صورت خطی در کنار یکدیگر قرار دارند (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر).

از یک صد نمونه آزمایش شده به وسیله‌ی روش Real-time PCR تعداد ۱۸ نمونه آلوده به DNA پروویروسی رتروویروس جاگزیکت گوسفند بودند (تصویر ۲). از این تعداد نمونه مثبت، ۱۵ نمونه مربوط به مبتلایان به پنومونی مزمن (فراوانی ۱۸/۷۵ درصد) و ۳ نمونه مربوط به گوسفندان به ظاهر سالم (۱۵ درصد) بودند.



تصویر ۲: نمودار مربوط به واکنش Real-time PCR

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون مربع کای همبستگی بین دو آزمایش Real-time PCR و هیستوپاتولوژی را معنی‌دار نشان داد ($P\leq ۰/۰۱$). اگرچه، آزمون مربع کای رابطه‌ی آماری بین نشانه‌های بالینی پنومونی یا سلامت ظاهری با هیچ یک از آزمایش‌های Real-time PCR و هیستوپاتولوژی را معنی‌دار ندانست، به ترتیب $P=۰/۶۹۶۲$ و $P=۰/۶۵۵۶$. علاوه بر این، این آزمون ارتباط معنی‌داری بین نتایج حاصل از سن و جنس با میزان آلودگی به ویروس این بیماری را نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

بحث

آدنوکارسینومای ریوی گوسفند یک بیماری مهم واگیردار ویروسی گوسفند است که در بسیاری از کشورهای پرورش دهنده‌ی گوسفند گزارش شده است (Sharp and De Martini 2003). از بین بردن این بیماری در یک گله بسیار دشوار است زیرا هیچ آزمایش کم هزینه‌ای برای شناسایی آلودگی با رتروویروس جاگزیکت در مراحل اولیه‌ی بالینی در دسترس نیست. مطالعات

اندکی برای شناسایی رتروویروس جاگزیکت در ایران انجام شده و برآورد شیوع این بیماری در ایران و به عنوان یک نتیجه، تأثیر اقتصادی این بیماری مشخص نیست. Khodakaram-tafti و Razavi در سال ۲۰۱۰ از نظر ظاهری تنها ۲۱ مورد از ۹۴۰۰ نمونه ریه‌ی گوسفند کشتار شده در استان فارس را آدنوکارسینوم ریوی تشخیص دادند. در یک مطالعه کشتارگاهی روی ۴۶۸ نمونه ریه از گوسفندان کشتار شده در حومه‌ی تبریز، شیوع آدنوکارسینوم ریوی ۲/۵۷ درصد به دست آمد (Rezazadeh et al. 2012). به علاوه، Rezazadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ شیوع آلودگی به رتروویروس جاگزیکت در شمال غرب ایران را به وسیله‌ی PCR حدود ۱۸ درصد گزارش کردند.

مزایای روش Real-time PCR بر PCR معمولی به طور کلی حساسیت و ویژگی بالاتر Real-time PCR و زمان کوتاه‌تر مورد نیاز برای تشخیص می‌باشد. شناسایی و تجزیه و تحلیل فرآورده Real-time PCR در طول فرآیند تکثیر به طور همزمان توسط نرم افزار صورت می‌پذیرد، در حالی که در مورد PCR معمولی، به دست آوردن نتیجه، نیازمند یک مرحله‌ی اضافی دیگر و استفاده از الکتروفورز محصول در ژل آگارز و به تبع آن استفاده از اتیدیوم بروماید و اشعه UV می‌باشد که می‌توانند برای سلامت انسان زیان‌بار باشند (Hoffmann et al. 2009, Lanciotti et al. 2000, Mackay et al. 2002).

در پژوهش حاضر، از پروب TaqMan و یک جفت پرایمر که بر اساس توالی LTR رتروویروس جاگزیکت که هدف آن قطعه‌ای به اندازه‌ی ۱۷۶ جفت باز بود و در سال ۲۰۱۰ توسط Kycko و Reichert گزارش شده بود، استفاده شد. با به کارگیری مجموعه‌ی یاد شده، DNA پروویروسی رتروویروس جاگزیکت در ۱۸ درصد نمونه‌ها (۱۵ مورد از ۸۰ نمونه گوسفندان مبتلا به پنومونی و ۳ مورد از ۲۰ نمونه گوسفندان به ظاهر سالم) شناسایی شد که نشان از میزان بالای آلودگی در گوسفندان به ظاهر سالم دارد. با وجود این، نشان داده شده است که به کارگیری PCR و یا Real-time PCR میزان عفونت ویروسی را بالاتر از آن چه که در بررسی‌های هیستوپاتولوژی یافت می‌شود، برملا می‌سازد (Kycko and Reichert 2010). این موضوع با گزارش‌های قبلی که تعداد حیوانات آلوده به ویروس جاگزیکت بسیار بیش‌تر از آن‌هایی هستند که بیماری را نشان می‌دهند، سازگاری دارد (Pusterla et al. 1995, Scott et al. 2010, Sharp and De Martini 2003). علاوه بر این، ضایعات هیستوپاتولوژی در ۱۱ نمونه مربوط به مبتلایان به پنومونی (فراوانی ۱۳/۷۵ درصد) و ۲ نمونه مربوط به گوسفندان به ظاهر سالم (فراوانی ۱۰ درصد)، در مجموع ۱۳ مورد از ۱۸ مورد مثبت در Real-time PCR مشاهده شد که حساسیت بالاتر این روش مولکولی را نسبت به هیستوپاتولوژی نشان می‌دهد. هر چند، با وجود این که تعداد ۵ مورد مثبت از یک صد نمونه‌ی مورد آزمایش هیستوپاتولوژی در مراحل اولیه‌ی بیماری آدنوکارسینوم ریوی بودند، آزمون مربع کای همبستگی بین دو آزمایش Real-time PCR و هیستوپاتولوژی را معنی‌دار نشان داد ($P\leq ۰/۰۱$) ولی همین آزمون آماری رابطه‌ی معنی‌داری بین نشانه‌های بالینی (پنومونی یا سلامت ظاهری) با هیچ یک از آزمایش‌های Real-time PCR ($P=۰/۶۹۶۲$) و هیستوپاتولوژی ($P=۰/۶۵۵۶$) نشان نداد. به نظر می‌رسد علت این عدم رابطه‌ی معنی‌دار به دلایل زیر باشد: الف) روش Real-time PCR در اولین مراحل آلودگی و سپس هیستوپاتولوژی در مراحل بعدی قادر به تشخیص درگیری دام هستند ولی بروز نشانه‌های بالینی در مراحل پیشرفته بیماری قابل تشخیص است . ب) همه‌ی پنومونی‌های مزمن قابل تشخیص در بالین، لزوماً توسط این ویروس ایجاد نمی‌شود.

دو نمونه مثبت هیستوپاتولوژی در گوسفندان به ظاهر سالم، یکی مربوط به یک گوسفند نر یک ساله با الگوی مراحل اولیه‌ی آدنوکارسینومای ریوی و دیگری مربوط به گوسفند نر دو ساله‌ای با الگوی آلوئولار بود. با توجه به این موضوع و همان‌گونه که در بالا آمد، در مجموع در ۵

نمونه ضایعات هیستوپاتولوژی مربوط به مراحل اولیه‌ی بیماری آدنوکارسینومای ریوی می‌باشد و این موضوع می‌تواند بر استفاده از روش Real-time PCR به عنوان یک تست برای تائید تشخیص در موارد بالینی مشکوک و یا به کارگیری آن به عنوان یک روش غربالگری در کنترل و یا ریشه‌کنی این بیماری تاکید نماید.

در آزمون مربع کای ارتباط معنی‌داری بین نتایج حاصل از سن و جنس با شیوع بیماری به دست نیامد (P>۰/۰۵). البته باید توجه داشت که ترکیب گوسفندان ارجاعی به کشتارگاه از نظر سن و جنس با جمعیت گله در حالت طبیعی رابطه مستقیم نداشته و از این رو گاهی در مقایسه-ی آماری نیز انتظار به دست آمدن یافته‌های قابل تعمیم به جمعیت وجود ندارد. در تایید یافته‌های این پژوهش، نتایج به دست آمده از یک بررسی که در سال ۲۰۰۴ در کشور اسپانیا در خصوص آدنوکارسینومای گوسفند صورت گرفت، هیچ ارتباط معنی‌داری در ارتباط با شیوع این بیماری با جنس را نشان نداد. در مطالعه یاد شده، بیش‌ترین سن بروز بیماری در سن ۱ تا ۴ سالگی گزارش شده است (Salvatori et al. 2004). علاوه بر این، نشان داده شده است که ارتباط بین فاکتور سن و آدنوکارسینومای گوسفند به وسیله‌ی گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های هدف رتروویروس جاگزیکت در ریه‌ی گوسفندان مشخص می‌شود (Salvatori et al. 2004). در بررسی دیگری که در کشور انگلستان انجام شده است، نشان داده شد که حیوانات در سنین پایین دارای میزان بالایی از سلول‌های زایای آلوئولی ریوی[1] هستند که یک فاکتور فزاینده در بروز عفونت است. بنابراین، حیوانات جوان‌تر در بروز عفونت مستعدتر هستند. علاوه بر این، در صورت ایجاد ضایعات ریوی، سلول‌های زایای آلوئولی ریوی در ریه‌ی حیوانات زیادتر شده و منجر به افزایش استعداد آلودگی به رتروویروس جاگزیکت در گوسفندان می‌گردد (Dungal et al. 1938).

در مطالعه‌ی Khodakaram-tafti و همکاران در سال ۲۰۰۹ RT-PCR برای شناسایی رتروویروس جاگزیکت روی نمونه‌های ریه ده رأس گوسفند از نژاد مخلوط ایرانی در گله‌های استان فارس که به بیماری آدنوکارسینومای ریوی مبتلا شده بودند و ده رأس گوسفندی که به ظاهر سالم بودند و در اثر تماس نزدیک با گوسفندان مبتلا در همان گله‌ها بودند، به کار گرفته شد. توده‌ی توموری در نمونه‌های ریه‌ی گوسفندان مبتلا مشاهده شد و آزمایش هیستوپاتولوژی آدنوکارسینومای ریوی را تایید نمود. علاوه بر این، نتیجه RT-PCR برای شناسایی رتروویروس جاگزیکت در ریه‌ها در ۱۰۰ درصد موارد مثبت بود. از سوی دیگر، آن‌ها در ریه هیچ یک از حیوانات به ظاهر سالم در تماس، ضایعه‌ای مشاهده نکردند ولی نتایج RT-PCR در چهار گوسفند مثبت بود. این مسئله بیان‌گر این موضوع می‌باشد که این ۴ گوسفند در تماس با گوسفندان بیمار، آلوده به رتروویروس جاگزیکت و در مراحل تحت بالینی و بدون ظهور علائم بیماری می‌باشند و این طور به نظر می‌رسد که عفونت تحت بالینی با رتروویروس جاگزیکت منجر به شیوع بسیار بالای بیماری در گله می‌شود. در پاسخ به این سوال که چرا تنها در ۴۰ درصد از حیواناتی که در تماس با دام‌های آلوده بودند نتایج مثبت به دست آمده است، می‌توان چنین پاسخ داد که این حیوانات ممکن است در مرحله‌ی بروز علائم باشند که تکثیر ویروس منجر به شکل‌گیری ضایعات نئوپلاستیک خواهد شد یا وجود فاکتورهای مستعدکننده‌ی بیماری مانند سیستم ایمنی ضعیف در دام‌ها اجازه‌ی تکثیر ویروس را فراهم می‌آورد (Khodakaram-tafti et al. 2009). در تایید این موضوع می‌توان به نتایج پژوهشی که در کشور آلمان در سال ۲۰۱۰ در خصوص نقش مؤثر عنصر سلنیوم به عنوان یک عنصر تأثیرگذار بر سیستم ایمنی بدن در پیشرفت بیماری آدنو کارسینوم ریوی صورت گرفته اشاره داشت. در مطالعه‌ی یاد شده، ۱۶ گوسفند آلوده به رتروویروس جاگزیکت در دو گروه درمانی با دریافت جیره‌ی حاوی

1- Lung alveolar proliferating cell

سلنیوم به میزان کم‌تر از ۰/۰۵ و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که در گروه دریافت‌کننده‌ی سلنیوم بالاتر، پیشرفت بیماری کم‌تر بود (Humann-Ziehank et al. 2013). بنابراین بررسی جیره‌ی غذایی گوسفندان و تغذیه با مواد غذایی غنی از سلنیوم می‌تواند یک عامل در کاهش شدت بیماری مطرح باشد. از آن جایی که به طور کلی خاک کشور ایران از نظر میزان سلنیوم فقیر می‌باشد (Nazemi et al. 2011) بنابراین می‌توان عملکرد ناکافی سیستم ایمنی گوسفندان و افزایش استعداد ابتلاء آن‌ها به بیماری را نیز مورد توجه قرار داد.

آدنوکارسینومای ریوی گوسفند در اکثر موارد به شکل تحت بالینی بروز می‌کند و به خاطر عدم وجود تست‌های مناسب جهت تشخیص بیماری در مراحل اولیه یا شکل تحت بالینی، جلوگیری از گسترش بیماری بسیار مشکل است. علاوه بر این، تاکنون واکسن مناسبی علیه بیماری ساخته نشده است و هیچ درمان مؤثری برای گوسفندان دارای تومور ریوی شناخته و یا به کار گرفته نشده است. با توجه به این که این بیماری منجر به ضرر و زیان اقتصادی می‌شود، میزان آلودگی در این بررسی کشتارگاهی نشان می‌دهد که باید مطالعات بیش‌تری برای تعیین شیوع واقعی این بیماری در منطقه و برآورد زیان-های اقتصادی ناشی از آلودگی با رتوویروس جاگزیکت انجام شود و همان طور که پیشتر یاد شد، به نظر می‌رسد که بسته به امکانات موجود، روش‌های مولکولی مانند PCR و یا Real-time PCR برای این منظور انتخاب‌های مناسبی هستند. چنین اطلاعات ارزشمندی را می‌توان برای انتخاب ساز و کارهای مناسب به منظور کنترل و ریشه‌کنی آدنوکارسینومای ریوی گوسفندان به کار گرفت. اگرچه، با رعایت یک سری اصول بهداشتی همچون جدا کردن بره‌ها بلافاصله بعد از تولد از گله‌ی مادر و تغذیه‌ی بره‌ها با آغوز گاوی می‌توان از بروز این بیماری به میزان زیادی جلوگیری کرد (Cousens and Graham 2008).

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با اعتبارات صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در قالب طرح شماره ۸۷۰۴۱۸۹۳ انجام شده است. نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از خانم کریستینا کوزنس پژوهشگر انستیتو تحقیقات موردون انگلستان به خاطر ارسال الگوی نمونه‌برداری از ریه و تأمین پلاسمید حاوی ژن مورد نظر در این مطالعه و از آقای دکتر پویا زمانی دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه بوعلی سینا به دلیل همکاری در تجزیه تحلیل آماری یافته‌ها، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

نقشینه، رضا و سهرابی‌حقدوست، ایرج (۱۳۴۲). آدنوماتوز ریوی گوسفند در ایران. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۲۸، شماره ۳، صفحات ۳۹-۲۹.

Cousens, C.; Graham, M.; Sales, J. and Dagleish, M.P. (2008). Evaluation of the efficacy of clinical diagnosis Ovine Pulmonary adenocarcinoma. Veterinary Records, 162: 88-90.

De Las Heras, M.; Ortin, A.; Salvatori, D.; Perez de Villareal, M.; Cousens, C.; Ferrer, L.M. et al. (2005). A PCR technique for the detection of Jaagsiekte retrovirus in the blood suitable for the screening of virus infection in sheep flocks. Research in Veterinary Science, 79: 259-264.

Dungal, N..; Gislason, G. and Taylow, E.L. (1938). Epizootic adenomatosis in lung of sheep. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, 51: 46-66.

Garcia-Goti, M.; Gonzalez, L.; Cousens, C.; Cartobarria, N.; Extramiana, A.B.; Minguijon, E. et al. (2000). Sheep pulmonary adenomatosis: characterization of two pathological forms associated with Jaagsiekte retrovirus. Journal of Comparative Pathology, 122: 55-65.

Gonzales, L.; Garcia-Goti, M.; Cousens, C.; Dewar, P.; Contabarria, N.; Extramiana, A.B. et al. (2001). Jaagsiekte sheep retrovirus can be detected in the peripheral blood diuring pre-clinical of pulmonary adenamotosis. Journal of general virology, 82: 1355-1358.

Grego, E.; Demeneghi, D.; Aivarez, V.; De las Heras, M. and Ortin, A. et al. (2008). Colostrum and milk can transmission jaagsiekte retrovirus to lambs. Veterinary Microbiology. 130(3-4): 247-257.

Griffiths, D.J.; Martineau, H.M. and Cousens, C. (2010). Pathology and pathogenesis ovine pulmonary adenocarcinoma. Joujnal of Comparative pathology, 142 (4): 260-283.

Hoffmann, B.; Beer, M.; Reid, S.M.; Mertens, P.; Oura, C.A.; Van Rijn, P.A. et al. (2009). A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health. Vet Microbiol, 139: 1-23.

Holland, M.J.; Palmarini, M.; Garcia-Goti, M.; Gonzalez, L. McKendrick, I.; De Las Heras, M. et al. (1999). Jaagsiekte retrovirus is widely distributed both in T and B lymphocytes and in mononuclear phagocytes of sheep with naturally and experimentally acquired pulmonary adenomatosis. Journal of Virology, 73: 4004-4008.

Humann-Ziehank, E.; Renko, K.; Bruegmann, M.L.; Devi, V.R.; Hewicker-Trautwein, M.; Andreae, A. and Ganter, M. (2013). Long-term study of ovine pulmonary adenocarcinogenesis in sheep with marginal vs. sufficient nutritional selenium supply: Results from computed tomography, pathology, immunohistochemistry, JSRV-PCR and lung biochemistry. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 27 (4): 391-399.

Hunter, A.R. and Munro, R. (1983). The diagnosis and distribution of sheep pulmonary adenocarcinoma. British Veterinary Journal, 139: 153-164.

Khodakaram-tafti, A.; Mohammadi, A. and Mansoriyan, M. (2009). Detection of the jaagsiekte sheep retrovirus by RT-PCR in naturally ovine pulmonary adenocarcinoma-affected sheep and in apparently healthy in contact-sheep. Revue de Medecine Veterinaire. 160 (6): 319-323.

Khodakaram-tafti, A. and Razavi, Z. (2010). Morphopathological study of Occuring ovine polmunary adenocarcinoma in sheep. Iranian Journal of Veterinary Research, 11 (2): 134-138.

Kycko, A. and Reichert, M. (2010). PCR-based methods for detection of JSRV in experimentally and naturally infected sheep. Bulltein of Veteterinary Institute Pulawy, 54: 445-450.

Lanciotti, R.S.; Kerst, A.J.; Nasci, R.S.; Godsey, M.S.; Mitchell, C.J.; Savage, H.M. et al. (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. Journal of Clinical Microbiology, 38: 4066-4071.

Lewis, F.I.; Brulisauer, F.; Cousens, C.; McKendrick, I.J. and Gunn, G.J. (2011). Diagnostic accuracy of PCR for jaagsiekte sheep retrovirus using field data from 125 Scottish sheep flocks. The Veternary Journal, 187 (1): 104-108.

Mackay, I.M.; Arden, K.E. and Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research, 30: 1292-1305.

Nazemi, L.; Nazmara, S.; Eshraghyan, M.R.; Nasseri, S.; Djafarian, K.; Yunesian, M. et al. (2011). Selenium status in soil, water and essential crops of Iran. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering. Doi: 10.1186/1735-2746-9-11., 9, 1, 11.

Palmarini, M.; Datta, S.; Omid, R.; Murgia, C. and Fan, H. (2000). The long terminal repeat of Jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. Journal of Virology, 74: 5776-5787.

Palmarini, M.; Sharp, J.M.; De Las Heras, M. and Fan, H. (1999). Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. Journal of Virology, 73: 6964-6972.

Pusterla, N.; Braun, U.; Grest, P. and Ossent, P. (1995). Diagnosis of pulmonary adenomatosis in a sheep by biopsy from the lung using ultrasonography. Tierärztliche Umschau, 50: 340-343.

Rezazadeh, F.; Zarrini, G.H.; Cousens, C.H. and Attarilar, N. (2012). Prevalence of Jaagsiekte Sheep Retrovirus Infection in North-West Iran, Global Veterinaria, 9 (5): 535-540.

Salvatori, D.; Gonzalez, L.; Dewar, P.; Cousens, C.; De Les Heras, M.; Dalziel, R.C. et al. (2004). Successful induction of ovine pulmonary adenocarcinoma. Journal of General Virology, 85: 3319.

Scott, P.; Collie, D.; McGorum, B. and Sargison, N. (2010). Relationship between thoracic auscultation and lung pathology detected by ultrasonography in sheep. The Veterinary Journal, 186(1): 53-57.

Sharp, J.M. and De Martini, J.C. (2003). Natural history JSRV in sheep. Current Topics in Microbiology and Immunolugy, 275: 55-79.

Sharp, J.M. and Herring, A.J. (1983). Sheep pulmonary ademanotises: Demonstration of a protein which cross reacts with the major core proteins mason-pfizer monkey virus mammary tomur viruses. Journal of General Virology, 64: 2323-2327.

York, D.F.; Vigne, R.; Verwoerd, D.W. and Querat, G. (1992). Nuclotide sequence type D and B retroviruses of sheep and goats. Journal of Virology, 66: 4930-4939.

A survey on ovine pulmonary adenocarcinoma in sheep affected with chronic respiratory diseases by Real-time PCR

Bahari, A.[1*]; Sabouri Ghannad, M.[2]; Dezfoulian, O.[3]; Sadeghi-nasab, A.[1] and Rezazadeh, F.[4]

Received: 12.11.2015 Accepted: 23.02.2016

Abstract

Ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA) is a chronic respiratory disease with long incubation period, caused by Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV). The study was performed to evaluation TaqMan real-time PCR technique, as a highly sensitive and specific method, to investigate JSRV proviral DNA in whole blood samples from sheep with chronic pneumonia and apparently healthy cases in a slaughterhouse survey. Blood samples were taken via jugular venipuncture of 80 sheep with chronic pneumonia and 20 apparently healthy sheep. After slaughtering, lungs were carefully examined then tissue samples from ten fix locations of each lung and caudal mediastinal lymph node were collected for comparison real-time PCR assay results' to those of histopathological examinations. The blood samples were stored at -80 °C until DNA extraction. DNA samples were subjected to real-time PCR to investigate JSRV proviral DNA. Fifteen out of eighty blood samples (18.75%) from sheep affected by chronic pneumonia and three blood samples out of twenty apparently healthy sheep (15%) were found to be positive for JSRV proviral DNA by TaqMan real-time PCR. Moreover, 11 out of 80 (13.75%) corresponding lung samples from sheep affected by chronic pneumonia and 2 out of 20 (10%) corresponding lung samples from apparently healthy sheep showed microscopic changes consistent with OPA. *Chi square* test didn't show significant difference in the health status and real-time PCR ($p=0.69$) or histopathological findings ($p=0.66$). However, it showed that there was high relationship between the results of real-time PCR and histopathological assays ($p\leq 0.01$). Therefore, the present study confirmed that real-time PCR is a sensitive and specific test for accurate detection of JSRV infection in both pneumonic and apparently healthy sheep.

Key word: Adenocarcinoma, Retroviruses, Sheep, Real-time PCR, Histopathology

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khoramabad, Iran
4- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Corresponding Author: Bahari, A., E-mail: aliasghar.bahari@basu.ac.ir