



شناسایی ژنومی و ایمونولوژیک ویروس دیستمبر و بررسی عفونت همزمان آن با پارآنفلوانزای سگ تیپ دو

افسانه توکلی زانیانی^۱، اعظم مختاری*^{۱،۲}، عاطفه اسماعیل نژاد^۳

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: ویروس دیستمبر سگ (CDV) ویروسی بسیار مسری و عامل بیماری کشنده در گوشت خواران سراسر جهان است. ویروس دیستمبر کارآیی سیستم ایمنی میزبان را کاسته و باعث افزایش احتمال ابتلا به سایر عوامل بیماری‌زا می‌شود. هدف مطالعه حاضر جستجوی ویروس دیستمبر به روش ژنومی و ایمونولوژیک و بررسی عفونت همزمان با پارآنفلوانزای سگ تیپ ۲ (CpiV-2) بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه، در فاصله بهار ۹۷ تا زمستان ۹۸ تعداد ۵۰ نمونه خون و سواب چشمی، تنفسی و گوارشی از سگ‌های مشکوک به دیستمبر و ۵۰ نمونه از سگ‌های به‌ظاهر سالم اخذ شد. به‌منظور تشخیص اولیه ویروس دیستمبر به روش ایمونولوژیک از کیت ایمونوکروماتوگرافی سریع دیستمبر استفاده شد. برای جستجوی ژنومی هر دو ویروس، پس از استخراج RNA و انجام واکنش رونوشت برداری معکوس، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آزمون RT-PCR انجام شد.

یافته‌ها: نتایج ایمونوکروماتوگرافی سریع حاکی از ۲۹ نمونه در گروه سگ‌های مشکوک به CDV و یک نمونه مثبت در بین نمونه‌های گرفته شده از سگ‌های به‌ظاهر سالم بود. بر اساس نتایج آزمون RT-PCR، در گروه اول ۳۷ نمونه CDV مثبت و ۱۱ نمونه CpiV-2 مثبت بودند. همچنین، از نمونه‌های گرفته شده از سگ‌های معمولی، سه مورد CDV مثبت و یک نمونه CpiV-2 مثبت به‌دست آمد. در کل، فراوانی عفونت همزمان ۴٪ بود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از بررسی‌های آماری ارتباط معنی‌داری بین عفونت CVD و CpiV-2 به‌دست نیامد. به نظر می‌رسد انجام بررسی‌هایی از این دست با حجم نمونه بیشتر نتایج دقیق‌تری می‌دهد.

کلید واژه‌ها: دیستمبر، پارآنفلوانزا، جستجوی ژنومی، تشخیص ایمونولوژیک، سگ

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۷

پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۱/۲۰

موضوع:

بیماری‌های مشترک انسان - دام

نویسنده مسئول:

اعظم مختاری، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

ایمیل:

mokhtari_dvm@yahoo.com

مقدمه

شده است (۳). در مطالعه‌ای که توسط Avizeh و همکاران (۲۰۰۷) انجام شده است، شیوع CDV 52/17 درصد بوده است (۴).

CDV با هدف قرار دادن سلول‌هایی که مولکول فعال‌کننده پیام‌رسانی ۴ (SLAMF4) را بیان می‌کنند در میزبان‌های حساس باعث سرکوب ایمنی می‌شود (۵). این وضعیت اغلب به عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب نظیر *Bordetella bronchiseptica*، گونه‌های *Candida*، *Clostridium piliforme*، *Toxoplasma gondii*، *Dirofilaria immitis*، *Mycoplasma cynos* و *Talaromyces marneffeii* و ... شانس بروز و عفونت‌زایی می‌دهد. اگر چه به علت استفاده از واکسن ابتلا به CD به‌طور قابل ملاحظه‌ای در

ویروس دیستمبر سگ (CDV) ویروسی بسیار مسری است که در سراسر جهان باعث بیماری کشنده در گوشت‌خواران می‌شود. CDV عضو جنس *Morbillivirus* متعلق به خانواده *Paramyxoviridae* است که می‌تواند بعضی رده‌های سلولی از بافت‌های اپیتلیال دستگاه تنفسی، گوارش یا عصبی را آلوده کند (۱). مطالعات مربوط به بیماری دیستمبر سگ در بسیاری از کشورها از جمله در مناطقی که ویروس بومی است مانند هند، دانمارک، فنلاند، برزیل و آمریکای شمالی توصیف شده است (۲). به‌طور کلی، تعدادی گزارش از شیوع CDV در سگ‌های ایران وجود دارد. شیوع بالای CDV (۵۵/۶٪) در میان سگ‌های روستایی در شمال ایران گزارش

جمعیت سگ‌ها کاهش یافته‌است، اما این بیماری در بسیاری نقاط جهان بومی است (۶-۱۲).

عفونت ویروس دیستمبر به‌طور هم‌زمان به همراه ویروس‌های متداول دیگری نظیر پاروویروس تیپ ۲ سگ (CPV-2) آلفا هریس ویروس تیپ ۱ سگ و آدنوویروس‌های تیپ ۱ و ۲ سگ (CAV-1,2) گزارش شده است. اخیراً گزارش‌های جدیدی منتشر شده است که نشان می‌دهد عفونت CDV می‌تواند تسهیل کننده بروز بیماری‌های ناشی از ویروس‌های نوظهوری نظیر *kobuvirus* سگ، *pneumovirus* و کورونوویروس تنفسی سگ باشد. مطالعات جستجوی ژنومی و مولکولی حضور عوامل بیماری‌زای سگ را در سگ‌های واجد علامت و بی علامت نشان داده‌اند (۱۷-۱۳).

موربیلی ویروس‌ها شامل ویروس دیستمبر توسط آئروسل‌ها منتقل می‌شوند و شباهت‌های بالینی مانند تب، آبریزش شدید از بینی، سرفه و همچنین علائم تنفسی و دستگاه گوارش را که اغلب با عفونت‌های باکتریایی ثانویه پیچیده می‌شوند، ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، یکی از بدترین ویژگی‌های عفونت موربیلی ویروسی، سرکوب شدید موقت سیستم ایمنی است (۷).

ویروس دیستمبر معمولاً توسط آئروسل‌ها منتقل می‌شود و دستگاه تنفسی فوقانی را آلوده می‌کند. در طی ۲۴ ساعت اول پس از عفونت، ویروسی در ماکروفاژها و سلول‌های B و T تجمع یافته و بعداً، ذرات ویروسی از طریق مسیر لنفاوی به گره‌های لنفاوی برونش و لوزه‌ها گسترش می‌یابند (۱۹، ۱۸). تکثیر اولیه ویروس در بافت‌های لنفوئیدی منجر به سرکوب شدید سیستم ایمنی می‌شود (۲۱، ۲۰).

حدود دو تا چهار روز بعد از عفونت، مقدار زیادی از ذرات ویروسی در لوزه‌ها و همچنین گره‌های لنفاوی رتروفارینجینال و برونش وجود دارد. با این حال، تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای آلوده در دیگر ارگان‌های لنفی کم است. طی چهار تا شش روز پس از عفونت، تکثیر ویروس در بافت لنفوئیدی، مغز استخوان، تیروئید، طحال، گره‌های لنفاوی، گره‌های لنفاوی مزانتریک، پلاک‌های پاپیر، سلول‌های معده، سلول‌های Kupffer و سلول‌های تک‌هسته‌ای در اطراف عروق برونش و ریه اتفاق می‌افتد. سپس، بین روزهای دوم و ششم، با توجه به میزان بالای ضایعات ویروسی در ارگان‌های لنفی و همچنین لکوپنی ناشی از تخریب سلول‌های لنفاوی، هیپرترمی مشاهده می‌شود (۲۲).

بعد از ویرمی، حدود هشت تا ده روز پس از عفونت، CDV از طریق مسیرهای هماتوژن یا مایع مغزی نخاعی (CSF) به چندین

بافت اپیتلیال و سیستم عصبی مرکزی (CNS) انتشار می‌یابد (۱۹). لنفوسیت‌های عفونی در بافت اپیتلیال نفوذ کرده و ممکن است به‌صورت موضعی سبب ورود بسیار زیاد ویروس به سلول‌های اپیتلیال و به دنبال آن عفونت تنفسی، روده‌ای و ادراری شود. نفوذ لنفوسیت T و سلول‌های دندریتیک (DC) سبب تظاهرات پوستی بیماری می‌شود (۲۳).

در طی فاز حاد دیستمبر، لنفوپنی با کاهش مداوم سلول‌های CD4 + T، سلول‌های CD8 + T و سلول‌های CD21 + B از خون محیطی مشخص می‌شود. سلول‌های CD4 + T بیشترین سلول‌های هدف در طی عفونت حاد CDV هستند و کاهش CD4 + T در اندام‌های لنفی ناشی از تخریب سلول‌های CD8 + T است (۲۲، ۲۱). لنفوسیت‌های CD4 + T به مدت چندین هفته، احتمالاً به علت آپوپتوز ناشی از ویروس تخریب می‌شوند (۲۴، ۲۳)، در حالی که سلول‌های CD8 + T کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرند و نسبتاً سریع بهبود می‌یابند (۲۵).

کاهش سلول‌های سیستم ایمنی در گردش ممکن است به علت کاهش تولید سلول‌ها در اندام‌های لنفاوی اولیه و ثانویه و همچنین به علت آپوپتوز لکوسیت‌های خون محیطی باشد. مرگ سلولی برنامه ریزی شده در بافت‌های لنفی می‌تواند در تعداد قابل توجهی از سلول‌های غیر عفونی نیز اتفاق افتد که نشان دهنده وجود مکانیسم اضافی آپوپتوز مستقل از عفونت ویروسی است. مکانیسم‌های دیگر علاوه بر آپوپتوز که به‌طور مستقیم توسط ویروس ایجاد می‌شوند، از قبیل فعال شدن بیش از حد سیستم ایمنی بدن یا آپوپتوز سلول‌های لنفی از طریق پروتئین Fas، باید به‌عنوان مکانیسم‌های احتمالی مرگ سلولی در دیستمبر سگ، مورد توجه قرار گیرد (۲۷، ۲۶).

تخریب زودهنگام لنفوسیت‌ها به دلیل عفونت با ویروس دیستمبر موجب سرکوب ایمنی حیوانات آلوده می‌شود؛ با این حال، مکانیسم‌های بعدی که بر ارائه آنتی ژن و بلوغ لنفوسیت تأثیر می‌گذارد هنوز شناخته نشده‌است (۱۸).

ویروس پارا آنفلوآنزای سگ ((CPiV-2 یک RNA ویروس تک‌رشته‌ای متعلق به خانواده Paramyxoviridae بوده و بسیار شبیه به Simian Virus 5 است. ویروس پارا آنفلوآنزای سگ اولین بار توسط Binn و همکاران در سال ۱۹۶۷ به‌عنوان یک ویروس شبه Simian-5 از سگ‌های آزمایشگاهی دارای علائم تنفسی جدا شد. متعاقباً Crandell و همکاران (۱۹۶۸)، Appel و همکاران

دارای علائم درگیری سیستم تنفسی و مشکوک به دیستمپر بودند و ۵۰ نمونه از سگ‌های به‌ظاهر سالم تهیه گردید.

ایمونوکروماتوگرافی سریع دیستمپر

برای تشخیص اولیه ویروس دیستمپر از کیت ایمونوکروماتوگرافی سریع ویروس دیستمپر استفاده شد. برای تشخیص سریع با این کیت‌ها می‌توان از ترشحات چشم، بزاق، ادرار و خون استفاده کرد. در مطالعه حاضر، نمونه‌های سواب‌های چشمی - تنفسی چشم اخذ شده برای آزمایش برای شناسایی ویروس distemper از کیت VetALL SensPERT Canine Distemper Virus Test Test Kit, CDV Ag استفاده شد. به‌طور خلاصه نمونه سواب اخذ شده در بافر تهیه شده توسط کیت قرار گرفته و برای رقیق شدن نمونه چند بار حرکت داده می‌شد. سپس با استفاده از قطره چکان تعبیه شده در کیت، مقدار ۱۰۰ μL محلول نمونه مورد آزمایش کشیده شده و این مقدار نمونه (تقریباً ۴ قطره) در سوراخ بیضوی شکل مخصوص لود نمونه ریخته می‌شد و از همین لحظه، زمان در نظر گرفته می‌شد. باید دقت شود که مقدار نمونه بیش از ظرفیت چاهک نباشد. پس از جذب محلول نمونه در پد صفحه تست، ظهور باند قرمز در موقعیت‌های C (کنترل) و T (تست) نشان‌دهنده مثبت بودن نتیجه تست است.

استخراج RNA و واکنش رونوشت برداری معکوس

برای تشخیص CDV و CPiV-2، RNA از بافی کوت مطابق با دستورالعمل سازنده با کیت QIAamp Viral Cat No: 5290 (Qiagen) استخراج شد. به‌منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده، جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ قرائت گردید. واکنش RT با استفاده از کیت TaqMan Reverse Transcription Reagents /N8080234 (Invitrogen, آلمان) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. به‌طور خلاصه، واکنش در حجم ۱۰ μL و شامل ۱ μL از بافر RT x10، 2.2 μL از 25 mM MgCl_2 ، 2 μL از 0.5 mM dNTP، 0.5 μL از Random hexamers، 0.2 μL از مهارکننده RNase، 25/0 μL از آنزیم رونوشت بردار معکوس (150 U/ μL) (MMLV RT) و مقدار محاسبه شده از RNA الگو - آب عاری از DNase/RNase (ng/ از 400-500 μL) و آب دیونیزه استریل بود. برنامه‌ریزی حرارتی واکنش RT شامل: ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. سپس نمونه‌های cDNA در دمای ۲۰ درجه سلسیوس برای آزمایش PCR نگهداری شدند.

Rosenberg (۱۹۷۰)، همکاران (۱۹۷۱)، Cornwell و همکاران (۱۹۷۶)، Mc Candish و همکاران (۱۹۷۸) و بسیاری دیگر محققان این ویروس را گزارش کردند. CPiV-2 ویروسی بسیار مسری است. از مهم‌ترین علائم عفونت حاصل از این ویروس می‌توان به سرفه‌های خشک اشاره کرد. تب خفیف، ترشحات بینی، کمبود انرژی و از دست دادن اشتها از سایر علائم بیماری هستند. تجمع و نگهداری سگ‌ها در پناهگاه‌ها و مراکز پرورش و یا تماس با سگ بیمار سبب انتشار بیشتر بیماری می‌شود. واکسیناسیون و تجویز مواد تقویتی برای توله‌سگ‌ها می‌تواند سگ‌ها را از ابتلا به ویروس حفظ کنند. در مقایسه با بالغین، توله‌سگ‌ها نسبت به ذات‌الریه آسیب‌پذیرتر هستند. آلودگی عموماً منجر به سرفه‌های کوتاه‌مدت، همراه با تعدادی علائم عمومی می‌شود. با وجود واکسیناسیون این ویروس هنوز هم از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای دستگاه تنفسی سگ است (۲۷).

به دلیل تأثیر ویروس دیستمپر بر کارایی سیستم ایمنی میزبان و در نتیجه افزایش احتمال ابتلا به سایر عوامل بیماری‌زا، مطالعه حاضر با هدف بررسی عفونت هم‌زمان ویروس دیستمپر و پارآنفلوانزای سگ به روش جستجوی ژنومی و سرولوژیک انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری در فاصله بهار ۹۷ تا زمستان ۹۸ از سگ‌های ارجاعی به کلینیک‌های شهر اصفهان انجام شد. تعیین سن بر اساس اظهارات مالک حیوان و بررسی دندان‌های حیوان انجام گرفت. به‌منظور نمونه‌برداری ابتدا حیوان به‌صورت فیزیکی مقید شده، از نظر وجود نشانه‌های بالینی مورد معاینه قرار می‌گرفت. در صورت وجود علائم بیماری، از مخاطات تنفسی و گوارشی سواب تنفسی برای بررسی با استفاده از کیت تشخیص سریع آنتی‌ژن دیستمپر (بیوتک، چین) اخذ می‌شد. حیوان با استفاده از ترکیب کتامین (آلفاسان، هلند) - آسپرومازین (هوگسترانی، بلژیک) به‌صورت شیمیایی مقید شده و پس از ثبت سن و جنس، ۳ mL خون از ورید سافن یا سفالیک اخذ و برای جداسازی سرم به آزمایشگاه منتقل می‌شد. جداسازی سرم و بافی کوت از خون توسط سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه صورت می‌گرفت. هم‌زمان نمونه سواب چشمی، تنفسی و گوارشی نیز از حیوان مقید شده تهیه شده و در PBS استریل انداخته می‌شد. تا زمان انجام آزمایشات نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این مطالعه ۵۰ نمونه سرم از سگ‌هایی که

RT-PCR

تست PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تشخیص CDV و CpiV-2 انجام شد. توالی آغازگرها به شرح زیر بود: CadF: AAGCCTCACACTGTTCAAG -3', CadR: GATTAGGACTATAATGACATGC -3' and Capi2F: ACAATCCCACCTACAACAC -3', Capi2R: 5'-AATCCGTAGGCAGAATAG -3'. برای تشخیص CpiV-2، برنامه حرارتی PCR شامل واسرشتی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه و به دنبال آن توسعه نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. چرخه‌ها و شرایط دمایی PCR برای شناسایی CDV مشابه با CpiV2 انجام شد. تنها تفاوت این بود که دمای اتصال ۵۷ درجه سلسیوس بود. در هر آزمون از کنترل‌های منفی و مثبت استفاده شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز در آگارز ۱٪ با رنگ آمیزی با Green viewer مورد الکتروفورز قرار گرفته و با مارکر DNA (۵۰ جفت باز، Fermentas) مقایسه شدند. سپس محصولات PCR در یک سیستم توالی‌یابی دی داکسی فلورسنت خودکار توالی‌یابی شدند (Bioneer، کره).

تحلیل آماری

پس از ورود اطلاعات در نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) و ترسیم جدول توافقی دو طرفه، رابطه بین متغیرها با استفاده از آزمون مجذور کای بررسی شد.

یافته‌ها

ایمونوکروماتوگرافی سریع دیستمپر

در مجموع از ۵۰ نمونه اخذ شده از سگ‌های واجد علائم مشکوک به دیستمپر با استفاده از کیت ایمونوکروماتوگرافی سریع ۲۹ نمونه مثبت تشخیص داده شد و از ۵۰ نمونه گرفته شده از سگ‌های به‌ظاهر سالم ۱ نمونه مثبت تشخیص داده شد. نتایج در جدول ۱ خلاصه شده است.

RT-PCR

باند‌های اختصاصی CDV و CpiV به ترتیب با اندازه‌های ۱۰۰ جفت باز و ۱۰۲ جفت باز به ترتیب در نمونه‌های مثبت برای هر یک از آنها شناسایی شدند. محصولات RT-PCR مثبت در همان اندازه محصولات کنترل مثبت بودند (شکل ۱ و ۲).

درجه تشابه توالی استخراج شده از خوانش محصول PCR ژن‌های مورد مطالعه با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن برای ویروس distemper و CpiV-2، به خوبی نشان‌دهنده کفایت PCR بود (شکل‌های ۳ و ۴).

در مجموع از ۵۰ نمونه اخذ شده از سگ‌های واجد علائم مشکوک به دیستمپر با استفاده از آزمایش RT-PCR 37 نمونه مثبت از نظر حضور اسید نوکلئیک دیستمپر تشخیص داده شد و از ۵۰ نمونه گرفته شده از سگ‌های به‌ظاهر سالم ۳ نمونه مثبت از نظر حضور اسید نوکلئیک دیستمپر تشخیص داده شد. با استفاده از آزمایش RT-PCR مخصوص تشخیص پارائفلوانزای سگ از تعداد کل ۵۰ نمونه اخذ شده از سگ‌های مشکوک به داشتن علائم بالینی دیستمپر ۱۱ نمونه از نظر حضور اسید نوکلئیک ویروس پارائفلوانزای سگ مثبت بودند و از بین ۵۰ نمونه از سگ‌های به‌ظاهر سالم ۱ نمونه از نظر وجود اسید نوکلئیک این ویروس مثبت تشخیص داده شد. فراوانی موارد عفونت توأم ۴ مورد در نمونه‌های اخذ شده در سگ‌های واجد علائم مشکوک به دیستمپر بود.

بررسی آماری

پس از وارد کردن اطلاعات در نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و رسم جدول دو طرفه توافقی، ارتباط بین متغیرها با استفاده از آزمون کای دو بررسی شد و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ هیچ ارتباط آماری معنی‌داری بین دو بیماری، نتایج RT-PCR CpiV و جنسیت و نتایج RT-PCR CDV و جنسیت به‌دست نیامد ($P > 0/05$) (جدول ۴-۱). با این وجود رابطه بین نتایج RT-PCR ویروس‌های CpiV-2 و CDV با علائم دیستمپر و گروه‌های سنی از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (جدول ۵-۱۳).

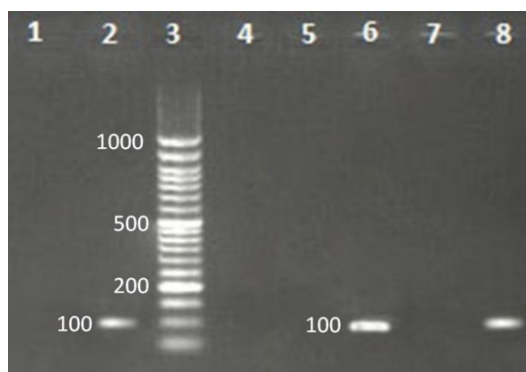


Figure 1. Electrophoresis gel of CDV RT-PCR products.

1: Negative control, 2,8: CDV positive RT-PCR products (100 bp), 6: Positive control (100 bp) 6: Ladder (50 bp)

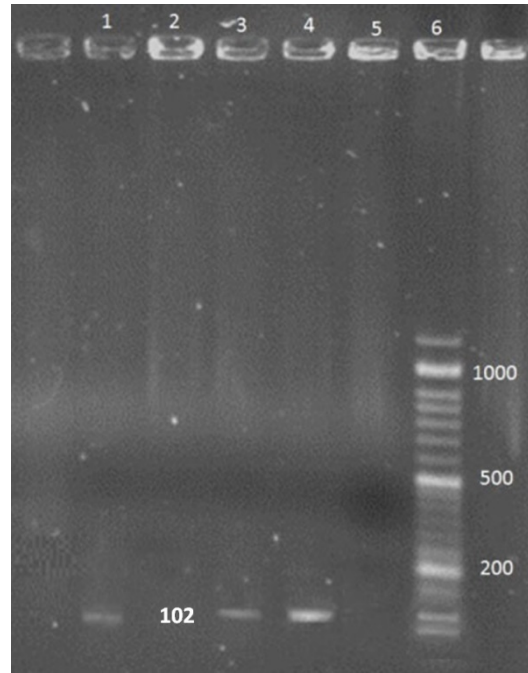


Figure 2. Electrophoresis gel of CpiV-2 RT-PCR product.

1,3: CpiV-2 (102 bp) positive PCR product, 2: Negative control, 4: Positive control, 6: Ladder (50 bp)

COVID-19 is an emerging, rapidly evolving situation.
Get the latest public health information from CDC: <https://www.cdc.gov/covid/>.
Get the latest research from NIH: <https://www.nih.gov/coronavirus>.
Find NCBI SARS-CoV-2 literature, sequence, and clinical content: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>.

BLAST » [blastn suite](#) » results for RID-JRMEK640016

Job Title: Cad F. ab1...
RID: JRMEK640016 Search expires on 08-07 17:48 pm
Program: BLASTN
Database: nt
Query ID: tcj|Query_41277
Description: None...
Molecule type: dna
Query Length: 100

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Canine morbillivirus isolate BJ16C9, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	MF926604.1
Canine morbillivirus isolate BJ16C8, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	MF926603.1
Canine morbillivirus isolate BJ16C7, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	MF926602.1
Canine morbillivirus isolate BJ16C0, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	MF926601.1
Canine morbillivirus isolate BJ16B35, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	MF926599.1
Canine distemper virus isolate Nob1, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	KY971530.1
Canine distemper virus isolate Bucharest, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	KY971529.1
Canine distemper virus strain CDV-L, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	KM826812.1
Canine distemper virus strain Snyder Hill culture-collection ATCC:VR-1567, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	JN898887.1
Canine distemper virus strain Shushky, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	HM063009.1
Canine distemper virus strain Phoca/Caspar/2007, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	HM046466.1
Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	GU1138403.1
Canine distemper virus isolate CDV3-C nucleocapsid protein (C) mRNA, partial cds	185	185	100%	2e-43	100.00%	FJ977379.1
Canine distemper virus strain CDV3, complete genome	185	185	100%	2e-43	100.00%	EU728268.1
Canine distemper virus strain Lederle nucleoprotein gene, complete cds	185	185	100%	2e-43	100.00%	EF418783.1
Canine distemper virus strain CDV3 nucleocapsid protein (NP) gene, complete cds	185	185	100%	2e-43	100.00%	EF375619.1

Sequence ID: [MF926604.1](#) Length: 15690 Number of Matches: 1
Range 1: 125 to 224

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
185 bits(100)	2e-43()	100/100(100%)	0/100(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	60			
Sbjct 125	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	184			
Query 61	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	100			
Sbjct 185	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	224			

Canine morbillivirus isolate BJ16C8, complete genome
Sequence ID: [MF926603.1](#) Length: 15690 Number of Matches: 1
Range 1: 125 to 224

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
185 bits(100)	2e-43()	100/100(100%)	0/100(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	60			
Sbjct 125	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	184			
Query 61	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	100			
Sbjct 185	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	224			

Canine morbillivirus isolate BJ16C7, complete genome
Sequence ID: [MF926602.1](#) Length: 15690 Number of Matches: 1
Range 1: 125 to 224

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
185 bits(100)	2e-43()	100/100(100%)	0/100(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	60			
Sbjct 125	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	184			
Query 61	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	100			
Sbjct 185	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	224			

Canine morbillivirus isolate BJ16C0, complete genome
Sequence ID: [MF926601.1](#) Length: 15690 Number of Matches: 1
Range 1: 125 to 224

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
185 bits(100)	2e-43()	100/100(100%)	0/100(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	60			
Sbjct 125	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	184			
Query 61	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	100			
Sbjct 185	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	224			

Canine morbillivirus isolate BJ16B35, complete genome
Sequence ID: [MF926599.1](#) Length: 15690 Number of Matches: 1
Range 1: 125 to 224

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
185 bits(100)	2e-43()	100/100(100%)	0/100(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	60			
Sbjct 125	AAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTGGGGACCAACCCCTCTGGCTCTGGCTCCGGGGG	184			
Query 61	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	100			
Sbjct 185	AGCAATAMAGGGAATAAGCATGTCTATTATAGTCTTAATC	224			

Figure 3. Alignment of CDV RT-PCR product sequence with the sequences registered in the gene bank.

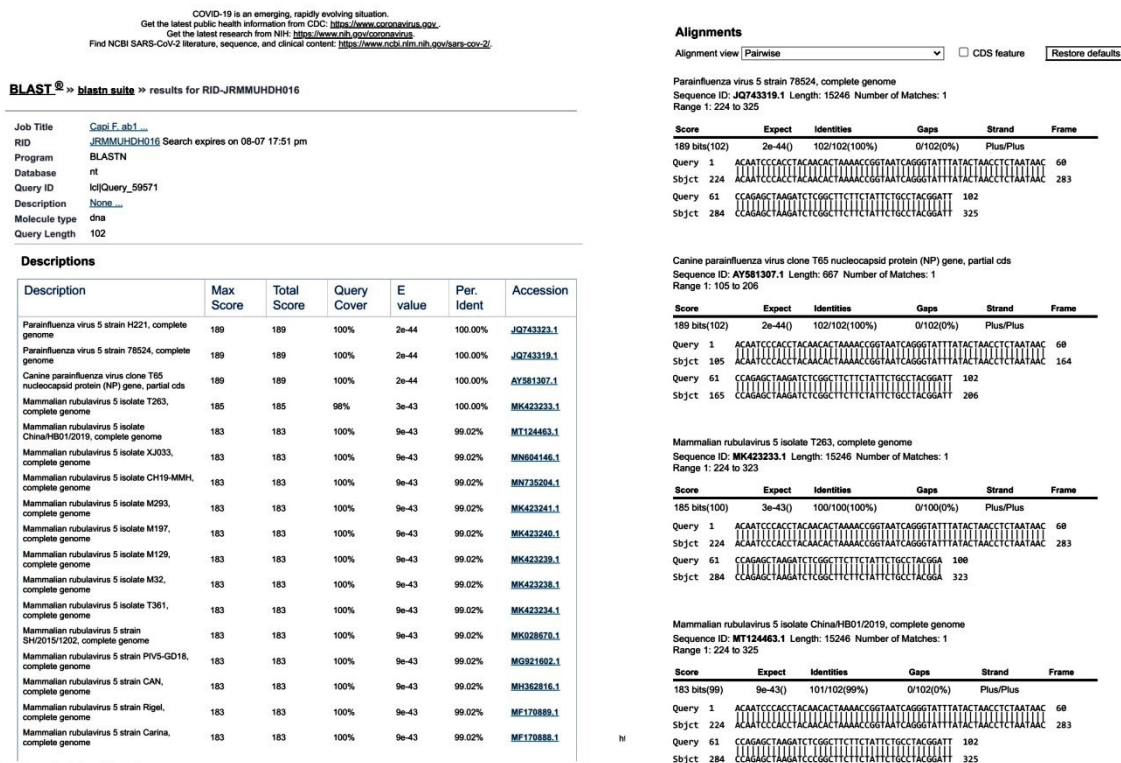


Figure 4. Alignment of CpiV-2 RT-PCR product sequence with the sequences registered in the gene bank

بحث

ویروس دیستمبر، مطالعه حاضر به منظور شناسایی عفونت توأمان ویروس دیستمبر و پارآنفلوانزای سگ به عنوان یکی دیگر از عوامل بیماری‌زای تنفسی سگ‌ها انجام شد و علی‌رغم شناسایی عفونت هم‌زمان این دو ویروس در چهار درصد موارد، ارتباط معنی‌دار آماری بین ابتلا به دیستمبر و پارآنفلوانزای سگ به دست نیامد. احتمالاً محدودیت مطالعه حاضر در دسترسی به تعداد بالاتر از سگ‌های واجد علائم بالینی دیستمبر و در نتیجه حجم نمونه پایینی می‌تواند یکی از دلایل به دست نیامدن رابطه معنی‌دار آماری بین ابتلا به دو ویروس باشد.

استفاده از کیت تشخیصی دیستمبر بهترین گزینه برای تشخیص ویروس در بیمارستان‌های دامپزشکی است. به طوری که ویژگی و حساسیت آن در نمونه‌های به دست آمده از ملتحمه، مشابه روش Nested PCR و برابر ۱۰۰ درصد است، زیرا ویروس در فاز حاد، به سرعت غدد اشکی و ترشحات ملتحمه را آلوده می‌کند (۲۹).

واکسیناسیون نیز در نتیجه این آزمایش خللی وارد نمی‌کند. بنابراین می‌توان به راحتی از این روش در مناطقی با کمبود امکانات تشخیصی، بهره‌جست (۲۸، ۱۸).

تقریباً تمام سگ‌های مبتلا به دیستمبر لنفوپنی و ضعف در سیستم ایمنی بدن را تجربه می‌کنند و در نتیجه دیگر عفونت‌ها می‌توانند به بیماری اضافه شده و آنها را بیمارتر کنند. مکانیسم سرکوب سیستم ایمنی در بیماری دیستمبر به طور کامل شناخته نشده است و احتمالاً وابسته به فاکتورهای متعددی است. ابتدا بخشی از سلول‌ها آلوده شده و سپس اختلالات ایمنی طولانی مدت، حتی پس از پاک شدن خون محیطی از این ویروس در دوره نقاهت ادامه پیدا می‌کنند (۵). بنابراین احتمالاً مکانیسم‌های تضعیف‌کننده سیستم ایمنی در سلول‌هایی که به طور مستقیم با عفونت ویروسی درگیر نشده‌اند، نقش داشته باشند. با وجودی که ساز و کار دقیق سرکوب ایمنی ناشی از عفونت با ویروس دیستمبر به خوبی شناسایی نشده است اما تضعیف سیستم ایمنی در اثر این ویروس مورد قبول همه دانشمندان است. علامت‌های فاز ابتدایی ابتلا به ویروس دیستمبر در سگ معمولاً مربوط به ترشحات چشم، تب، از دست دادن اشتها و آبریزش بینی می‌شود و در این زمان سایر عفونت‌های تنفسی سگ ممکن است بروز پیدا کرده و تفکیک علائم هر عفونت امکان‌پذیر نباشد. به همین منظور و با توجه به احتمال بروز عفونت‌های بیشتر در اثر تضعیف ایمنی منتج از

سگ، آدنووایروس و پارووایروس را در سگ‌های خانگی را گزارش کردند (۱۰). نتایج تمام مطالعات برشمرده میزان بالای عفونت توأم دیستمپر با سایر عوامل بیماری‌زای سگ را نشان می‌دهد و فرضیه تأثیر این ویروس در افزایش استعداد ابتلا به سایر عوامل پاتوژن در اثر تضعیف سیستم ایمنی حیوان را تأیید می‌کند. با این وجود انجام مطالعات مشابه بیشتر در سایر میزبان‌های ویروس می‌تواند اطلاعات راجع به این نظریه را تأیید کند.

چشم انداز

شیوع بالای ویروس دیستمپر و احتمال ابتلا به عفونت همزمان با CDV در ایران و سایر مناطق بومی، و نیز گزارشات مربوط به این بیماری از سایر میزبانان، این مسئله را یادآور می‌شود که باید عفونت‌های پراکنده و همزمان در حیات وحش، جوندگان و سایر گونه‌های مرتبط با عفونت CDV بررسی شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر در مجموع از ۱۰۰ نمونه اخذ شده از سگ‌های واجد علائم مشکوک به و به‌ظاهر سالم فراوانی موارد عفونت توأم ۴ مورد و تنها در نمونه‌های اخذ شده در سگ‌های واجد علائم مشکوک به دیستمپر گزارش شد. با این وجود با استفاده از بررسی‌های آماری ارتباط معنی‌داری بین ابتلا به دیستمپر و پارائنفلوانزای سگ به‌دست نیامد. به‌نظر می‌رسد انجام بررسی‌هایی از این دست با حجم نمونه بیشتر نتایج دقیق‌تری به‌دست می‌دهد.

سپاسگزاری

ندارد.

تعارض در منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارضی در منافع گزارش نکردند.

منابع مالی

ندارد.

ما نتوانستیم گزارشی از عفونت همزمان دیستمپر و بیماری دیگری را در ایران پیدا کنیم. تعدادی گزارش از عفونت CDV از برخی از شهرها وجود دارد مانند مطالعه‌ای که در آن تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری سگ در سگ‌های روستایی واکسینه‌نشده در اهواز توسط آویزه و همکاران در سال ۲۰۰۷ بررسی شد. علاوه بر این Namroudi و همکاران (۲۰۱۵) در شمال و مرکز ایران خوشه قطب شمالی و اروپایی ویروس دیستمپر را شناسایی کردند (۳،۴).

Mochizuki و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی به بررسی عفونت‌های تنفسی فوقانی سگ‌های خانگی پرداختند. ویروس parainfluenza سگ (۷/۴٪) کورونایروس گروه ۱ (۴/۴٪)، آدنویروس نوع ۲ سگ (۲/۹٪)، کورونا ویروس گروه ۲ تنفسی سگ (۱/۵٪) و ویروس دیستمپر سگ (۱/۵٪) شناسایی شدند و تنها ۲ مورد عفونت مخلوط در این مطالعه گزارش گردید (۱۴).

در مطالعه انجام شده توسط Damián و همکاران در سال ۲۰۰۵ میلادی CDV در ۷۷٪ موارد، CAV در ۵۷٪ و CpiV در ۵۱٪ موارد شناسایی شد. شایع‌ترین ارتباط دوگانه بین CDV و CpiV و ۱۴٪ بود (۲۰).

در مطالعه Headley و همکاران در سال ۲۰۱۸ میلادی آلودگی‌های همزمان با ویروس دیستمپر به این صورت گزارش گردید: (۱۰۰٪) *N. caninum*، (۱۰۰٪) CPV-2، (۱۰۰٪) CAdV-1، و (۱۰۰٪) (۱۱) Aguiar و همکاران در سال ۲۰۱۲ میلادی به بررسی عفونت همزمان دیستمپر سگ و توکسوپلازما گوندی در سگ‌های واجد علائم عصبی پرداختند. ۸۰/۹٪ سگ‌ها از نظر CDV با استفاده از آزمون RT-PCR مثبت بودند و ۳۸/۱٪ از نظر آنتی‌بادی‌های ضد *T. gondii* مثبت گزارش شدند. ۴۱/۱٪ از نظر هر دو عامل مثبت بودند که نشان می‌داد عفونت توأم با هر دو پاتوژن صورت گرفته است (۳).

Headley و همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی در جنوب برزیل عفونت‌های همزمان ویروس دیستمپر با هرپس ویروس تیپ ۱

Referance

1. Isfahani MS, Rostami A, Bahonar A, Barin A, Memarian I. Serologic survey for canine distemper virus in free-ranging wild canids in the northeast of Iran. *Revue De Medecine Veterinaire*. 2017;168(10-12):247-51.
2. Namroudi S, Rostami A, Barin A, Ardebili KM. Antibody monitoring to canine distemper virus in unvaccinated rural dogs in the southern coastal region of Caspian sea. *Journal of Veterinary Research*. 2013;68(3):209-15.

3. Aguiar D, Amude A, Santos LGF, Ribeiro M, Ueno TEH, Megid J, et al. Canine distemper virus and *Toxoplasma gondii* co-infection in dogs with neurological signs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2012; 64(1): 221-224. [DOI:10.1590/S0102-09352012000100032]
4. Avizeh R, Shapouri MR, Akhlaghi N. Antibody titers against canine distemper virus in unvaccinated rural dogs from Ahvaz, Iran. *Pak J Biol Sci*. 2007 Nov 1;10(21):3970-2. doi: 10.3923/pjbs.2007.3970.3972. PMID: 19090267. [DOI:10.3923/pjbs.2007.3970.3972] [PMID]
5. Headley SA, Alfieri AA, Fritzen JT, Garcia JL, Weissenböck H, da Silva AP, Bodnar L, Okano W, Alfieri AF. Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013; 25: 129-135. [DOI:10.1177/1040638712471344] [PMID]
6. Headley SA, Graça DL, Costa MM, Vargas AC. Canine distemper virus infection with secondary *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in dogs. *Ciência Rural*. 1999 Dec;29(4):741-3. [DOI:10.1590/S0103-84781999000400030]
7. Headley SA & Saito TB. Simultaneous canine distemper encephalitis and canine parvovirus infection with distemper-associated cardiac necrosis in a pup. *Ciência Rural*, 2003; 33: 1075-1080. [DOI:10.1590/S0103-84782003000600023]
8. Headley SA, Shirota K, Baba T, Ikeda T, Sukura A. Diagnostic exercise: Tyzzer's disease, distemper, and coccidiosis in a pup. *Veterinary Pathology*, 46, 2009; 151-154. [DOI:10.1354/vp.46-1-151] [PMID]
9. Schulz BS, Kurz S, Weber K, Balzer HJ, Hartmann K. Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Veterinary Journal*, 2014; 201: 365-369. [DOI:10.1016/j.tvjl.2014.04.019] [PMID] [PMCID]
10. Headley SA, Bodnar L, Silva AP, Alfieri AF, Gomes LA, Okano W, Alfieri AA. Canine Distemper Virus with Concomitant Infections Due to Canine Herpesvirus-1, Canine Parvovirus, and Canine Adenovirus in Puppies from Southern Brazil. *Jacobs Journal of Microbiology and Pathology*, 2015; 1(2): 015. [DOI:10.1016/j.jcpa.2013.11.106] [PMCID]
11. Headley SA, Oliveira TES, Pereira AHT, Moreira JR, Michelazzo MMZ, Pires BG, et al. Canine morbillivirus (canine distemper virus) with concomitant canine adenovirus, canine parvovirus-2, and *Neospora caninum* in puppies: a retrospective immunohistochemical study. *Scientific Reports*, 2018; 8(1):13477. [DOI:10.1038/s41598-018-31540-0] [PMID] [PMCID]
12. Teixeira Ribeiro AI, da Cruz Burema M, de Souza Borges AP, de Melo Bruno VC, Brandini Néspoli PE, Colodel EM, Furlan Gouvêa FH, Dutra V, Nakazato L, Ribeiro MG, de Aguiar DM. Pyogranulomatous pleuropneumonia caused by *Nocardia asiatica* in a dog coinfecting with canine morbillivirus (canine distemper virus). *Veterinary medicine and science*. 2020 Feb;6(1):25-31.
13. Lavan R & Knesl O. Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters. *Journal of Small Animal Practice*, 2015; 56: 572-576. [DOI:10.1111/jsap.12389] [PMID] [PMCID]
14. Mochizuki M, Yachi A, Ohshima T, Ohuchi A, Ishida T. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2008; 70(6): 563-569. [DOI:10.1292/jvms.70.563] [PMID]
15. Vandeveld M & Zurbriggen A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, 2005; 109(1): 56-68. [DOI:10.1007/s00401-004-0958-4] [PMID]
16. Siering O, Sawatsky B, Pfaller CK. C Protein is Essential for Canine Distemper Virus Virulence and Pathogenicity in Ferrets. *Journal of Virology*. 2020. [DOI:10.1128/JVI.01840-20] [PMID]
17. Buragohain M, Goswami S, Kalita D. Clinicopathological findings of canine distemper virus infection in dogs. *J Entomol Zool Studies*. 2017;5:1817-9.
18. Headley S, Pretto-Giordano L, Lima S, Suhett W, Pereira A, Freitas L, et al. Pneumonia due to *Talaromyces marneffe* in a dog from Southern Brazil with concomitant canine distemper virus infection. *Journal of comparative pathology*. 2017;157(1):61-6. [DOI:10.1016/j.jcpa.2017.06.001] [PMID]
19. Petrova VN, Sawatsky B, Han AX, Laksono BM, Walz L, Parker E, et al. Incomplete genetic reconstitution of B cell pools contributes to prolonged immunosuppression after measles. *Science immunology*. 2019;4(41). [DOI:10.1126/sciimmunol.aay6125] [PMID]
20. Damián M, Morales E, Salas G, Trigo FJ. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. *Journal of Comparative Pathology*, 2005;133(4): 289-293. [DOI:10.1016/j.jcpa.2005.05.005] [PMID]
21. Feng H, Dong J, Chen Y, Shi L, Shen B, Sun X, et al. Nanoparticles of Conformation-stabilized Canine Distemper Virus Hemagglutinin are Highly Immunogenic and Induce Robust Immunity. 2020. [DOI:10.21203/rs.3.rs-74893/v1]

22. Wünschmann A, Kremmer E, Baumgärtner W. Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2000; 73(1): 83-98. [[DOI:10.1016/S0165-2427\(99\)00156-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00156-7)]
23. Kumagai K, Yamaguchi R, Uchida K, Tateyama S. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2004; 66(2): 175-181. [[DOI:10.1292/jvms.66.175](https://doi.org/10.1292/jvms.66.175)] [[PMID](#)]
24. Moro L, de Sousa Martins A, de Moraes Alves C, de Araújo Santos FG, dos Santos Nunes JE, Carneiro RA, et al. Apoptosis in canine distemper. *Archives of Virology*, 2003;148(1): 153-164. [[DOI:10.1007/s00705-002-0903-6](https://doi.org/10.1007/s00705-002-0903-6)] [[PMID](#)]
25. Tipold A, Vandeveld M, Wittek R, Moore P, Summerfield A, Zurbriggen A. Partial protection and intrathecal invasion of CD8+ T cells in acute canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, 2001; 83(3): 189-203. [[DOI:10.1016/S0378-1135\(01\)00422-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00422-9)]
26. Moro L, Martins AS, Alves CM, Santos FG, Del Puerto HL, Vasconcelos AC. Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *Journal of Veterinary Medicine*, 2003; 50(5): 221-225. [[DOI:10.1046/j.1439-0450.2003.00657.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00657.x)] [[PMID](#)]
27. Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, Griot C. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005; 104(1-2): 33-44. [[DOI:10.1016/j.vetimm.2004.09.032](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.032)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
28. Mosallanejad B, Avizeh R, Seyfiabad Shapouri MR, et al. Antigenic detection of Canine Parainfluenza virus in urban dogs with respiratory disease in Ahvaz area, southwestern Iran. *Archives of Razi Institute*, 2009; 2: 115-122.
29. An DJ, Kim TY, Song DS, Kang BK, Park BK. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *Journal of Virological Methods*. 2008;147(2):244-9. [[DOI:10.1016/j.jviromet.2007.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.09.006)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)].