اولین گزارش جداسازی پارووویروس سگ در ایران

دکتر فرهید همت زاده[1] دکتر شهرام جمشیدی[2]

هدف: جدا سازی و تأیید تشخیص یک مورد عفونت ویروسی در سگ با پارووویروس.

طرح: مطالعه موردی.

تاریخچه: سگ نر ۷ ماهه ای از نژاد مخلوط با علایم استفراغ، اسهال و بی اشتهایی به درمانگاه دامهای کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع داده شد. در معاینه بالینی دهیدراتاسیون شدید، حضور خون در مدفوع و در شمارش سلولهای خونی کاهش شدید تعداد WBC(۵۰۰/μl) جلب توجه نمود. نمونه مدفوع در آزمون تشخیص پادگنی ایمونوبلاتینگ پاسخ مثبت داد و پس از آماده سازی در کشت سلولی MDCK کشت داده شد. در پاساژ چهارم به بعد CPE واضح بعد از ۴-۳ روز ایجاد شده و از نمونه های حاصله در کیت تشخیصی پارووویروس سگ مجدداً پاسخ مثبت دریافت گردید. مشاهده همین نمونه پس از اولترا سانتریفوژ و آماده سازی در زیر میکروسکوپ الکترونی حضور ذرات پارووویروسی را نشان داد که دال بر جداسازی پارووویروس سگ از نمونه های مرضی مربوط به سگ مبتلا است.

نتیجه گیری: این گزارش اولین گزارش جداسازی پارووویروس سگ در ایران می باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۲، ۳۵-۳۳.

واژه های کلیدی: پارووویروس، سگ، اسهال، کشت سلول.

First report of isolation of canine parvovirus in Iran

Hemmatzadeh, F.,[1] Jamshidi, S.[2]

[1]*Depatrment of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.* [2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

Objective: Isolation and confirmation of canine Parvovirus in Iran.

Design: Case study.

Procedure: A 7 months male dog was reffered to Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, with clinical sings of vomiting, diarrhea and anorexia. In clinical examinations, severe dehydration, melena and in cell blood count, leukopenia were evident. Immunobloating test in order to antigen detection in stool sample was positive for canine parvovirus. The sample was cultured in MDCK cell line. In 4th passage many focuses of CPE were seen after 3-4 days, these cell culture fluids tested by antigen detection kits for canine parvovirus and received positive results from those samples, that confirm isolation of canine parvovirus from above mentioned case. A sample of cell cultuer supernstent, after preparation was studied by E.M and parvoviral particles was detected.

Conclusion: This if to first report of dog parrovirus isolation in Iran. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 2: 33-35, 2002.***

Key words: Parvovirus, Dog, Diarrhea, Cell culture. E.M.

ویروس عامل بیماری پارووویروس سگ متعلق به دون خانواده پارووویرینه، جنس پارووویروس از خانواده پارووویریده است. این ویروس واجد ژنوم DNA تک رشته ای، تک ملکولی با سنس معمولاً منفی واجد تقارن بیست وجهی و فاقد غشأ به اندازه ۲۵ نانومترمی باشد. اعضا جنس پارووویروس همانند اریتروویروس ها و برخلاف دپندوویروس ها توان تکثیر مستقیم در سلولهای حساس را داشته و نیاز به ویروس کمکی ندارند اما الزاماً می بایستی در سلولهای در حال تقسیم تکثیر نمایند. این نکته گویای اصل حاکم بر پاتوژنز پارووویروس ها نیز هست که این ویروس ها تأثیرات بیماریزایی خود را در سلولهای جنینی، دستگاه خونساز بویژه پیش سازهای گلبولهای سفید و سلولهای اپی تلیال دستگاه گوارش برجای می گذارند. از این اصل برای جداسازی و کشت پارووویروسها نیز استفاده می گردد (۳،۵،۷).

تاکنون دو نوع پارووویروس سگ مورد شناسایی قرار گرفته که به اسامی تیپ ۱ و تیپ ۲ پارووویروس سگ(CPV-1 & CPV-2)نامگذاری گردیده اند، تیپ ۱ را ویروس مینوت سگ نیز می گویند، بین تیپ ۲ و پارووویروس های گربه و سنجاب شباهتهای فراوانی وجود دارد. پارووویروس سگ توان تکثیر در سلولهای با منشأ سگ و گربه را داراست در حالی که پارووویروس گربه تنها در سلولهای با منشأ گربه قادر به تکثیر می باشد. عفونتهای پارووویروسی سگ در اکثر موارد ناشی از پارووویروس تیپ ۲ بوده که تفریق آن از تیپ ۱ با توسل به شیوه های ملکولی امکانپذیر است. راههای مختلفی برای تشخیص عامل این بیماری در آزمایشگاهها در دسترس می باشد که شامل کشت و جداسازی، الایزا، خنثی سازی سرم، واکنش زنجیری پلیمراز، و آزمونهای HA و HI می باشند. جالب توجه آنکه در شرایط اوج بیماری هر گرم مدفوع حاوی 10^9 ذره ویروس معادل ۲۰۰۰۰ واحد هماگلوتیناسیون می باشد (۲،۷،۸).

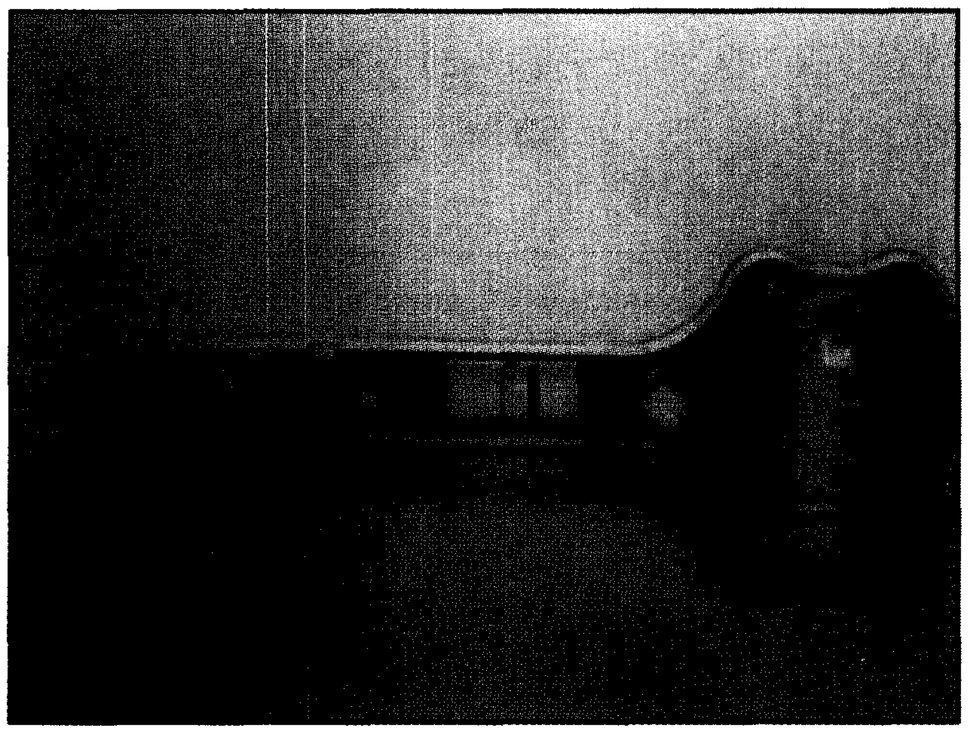
درمان بیماری به شکل درمان علامتی توسط جایگزینی مایعات و الکترولیتها و به کارگیری آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف مثل پنی سیلین و جنتامایسین و کنترل استفراغ توسط متوکلروپرامایدانجام می گیرد (۳).

مشاهدات بالینی: سگ نر ۷ ماهه ای از نژاد مخلوط با علایم استفراغ، اسهال و بی اشتهایی که از ۲ روز قبل تظاهر پیدا کرده بود به درمانگاه دامهای کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع داده شد. تاریخچه اخذ شده نشان می داد که حیوان به دفعات و بدون ارتباط با تغذیه، مواد غذایی را استفراغ کرده و محتویات استفراغی در ابتدا شامل مواد غذایی بوده که در نهایت حالت کف مانند و زرد رنگ پیدا کرده بود همچنین بر طبق اظهارات صاحب دام مدفوع حیوان نیز کاملاً شل و تیره رنگ شده بود.

در معاینه بالینی دهیدراتاسیون شدید (حدود ۱۰ درصد) به صورت کاهش قابلیت ارتجاعی پوست و گود رفتگی چشمها مشهود بود. علاوه بر آن در هنگام اخذ درجه حرارت، مدفوع باقیمانده بر روی ترمومتر حضور خون در مدفوع را تایید می نمود به شکلی که مدفوع کاملاً حالت قیری و سیاهرنگ داشت. در سابقه بهداشتی حیوان، انجام هیچ گونه واکسیناسیونی وجود نداشت.

یافته های آزمایشگاهی: انجام آزمون شمارش کلی سلولهای خون (CBC) بر روی نمونه خون اخذ شده از ورید سفالیک حاکی از کاهش شدید گلبولهای سفید خون (WBC = ۵۰۰ μl) بویژه تعداد نوتروفیلها (Neut = ۵۰ μl) بود. همزمان یک نمونه سرمی هم به منظور انجام

۱- گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲- گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



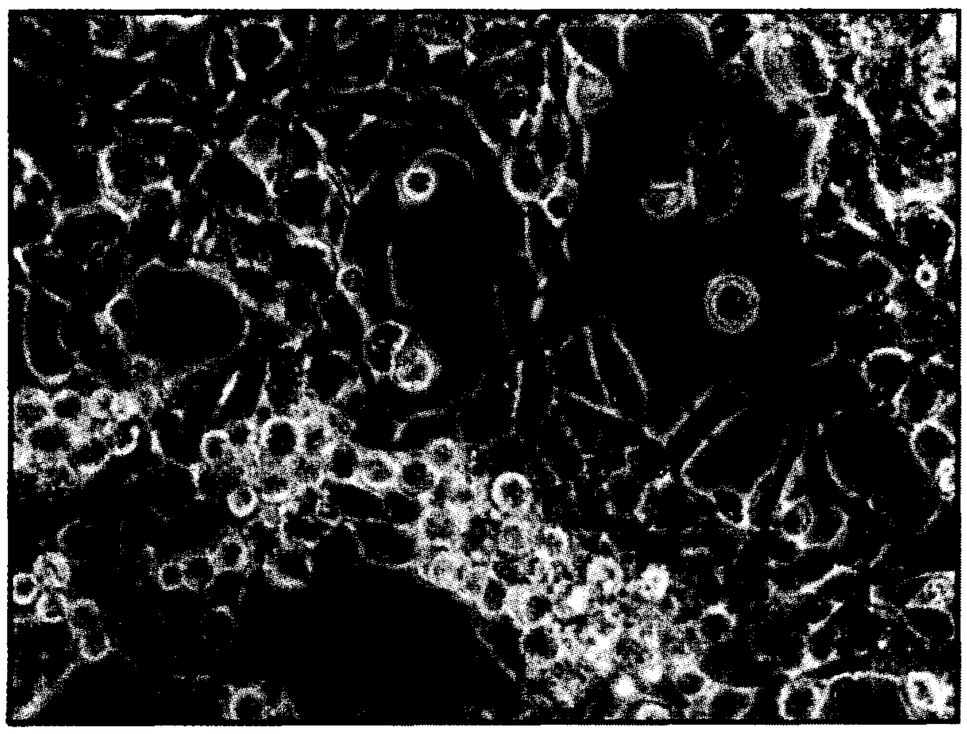
تصویر۱ - تشکیل دو باند مجزا به نشانه پاسخ مثبت در آزمون ردیابی پادگن.

آزمونهای سرولوژیک به ویژه تشخیص پادتن های ضد پارووویروس، تهیه گردید.

مقداری نمونه مدفوع توسط اسپاتول پلاستیکی ویژه نمونه برداری از رکتوم حیوان اخذ شده و بدواً، توسط کیت تشخیص پادگنی پارووویروس سگ ساخت شرکت سوانوویر سوئد به روش کروماتوگرافی و بلاتینگ مورد آزمایش قرار گرفت و پس از مشاهده پاسخ مثبت که به شکل تشکیل دو باند مجزا در روی غشأ نیتروسلولوزی کیت بود (تصویر۱)، اقدام به آماده سازی نمونه به منظور کشت نمونه مدفوع در کشت سلولی گردید. بدین منظور پس از اخذ نمونه در محیط ترانسپورت حاوی آنتی بیوتیک، بلافاصله شیرابه یکنواخت تهیه و پس از سانتریفوژ در ۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه مایع رو از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. مایع صاف شده به عنوان نمونه مشکوک ویروسی برداشت شده و تا لحظه آماده سازی سلول در فریزر ۸۰- نگهداری گردید.

کشت سلولی مورد استفاده تیره سلولی MDCK تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به کد NCBI C426 بود که پس از تریپسینه کردن و تهیه تعلیق سلولی مناسب میزان ۰/۵ میلی لیتر از نمونه مشکوک به پلیتهای ۲۴ سانتیمتری Nunc حاوی ۱۰ میلی لیتر تعلیق سلولی MDCK در محیط کشت سلولی RPMI حاوی ۱۰ درصد FCS اضافه شده و به مدت ۵ روز در انکوباتور ۳۷ درجه گرمخانه گذاری گردید. کشتهای تهیه شده به شکل روزانه جهت مشاهده هرگونه تغییر در سلولها مطالعه گردیدند. در روز اول و به ویژه در پاساژ اول آثار غیر اختصاصی توکسی سیته سلولی مشاهده گردید که نهایتاً در پاساژ سوم به بعد ضمن رفع عوارض مذکورCPE مشخص از روز سوم تا چهارم شروع و در روز ششم کامل می گردید (تصویر ۲). مایع کشت سلولی در پاساژهای چهارم و پنجم و ششم پس از یکبار ذوب و انجماد و آماده سازی اولیه، مجدداً با استفاده از کیت تشخیص پادگنی پارووویروس آزمایش شد که در این مراحل نیز حضور ویروس در کشتهای سلولی به تایید رسید. نمونه سرمی تهیه شده در روز اول فاقد پادتن های ضد پارووویروسی در آزمونSN بود که این نکته بر عدم ایمنی قبلی حیوان صحه گذاشت.

نمونه جدا شده در پاساژ پنجم پس از ذوب وانجماد به منظور آزاد سازی ویروسهای داخل سلول به روش کلاسیک خالص سازی پارووویروس اولترا سانتریفوژ شده و پس از آماده سازی و رنگ آمیزی منفی فسفو تنگستیک اسید با استفاده از میکروسکوپ الکترونی به جستجوی اجرام پارووویروسی



تصویر۲ - ایجاد CPEدر کشت سلولی MDCK ناشی از تکثیر پارووویروس.

پرداخته شد. با توجه به خالص سازی و تغلیظ نمونه مذکور اجرام پارووویروسی در زیر میکروسکوپ الکترونی به وضوح مشاهده گردیدند (تصویر ۳). این عمل به منظور تایید تشخیص جداسازی ویروس در کشت سلولی انجام گرفت. همگی موارد فوق حضور پارووویروس در این مورد را به تأیید قطعی رهنمون می سازند (۱،۴،۶).

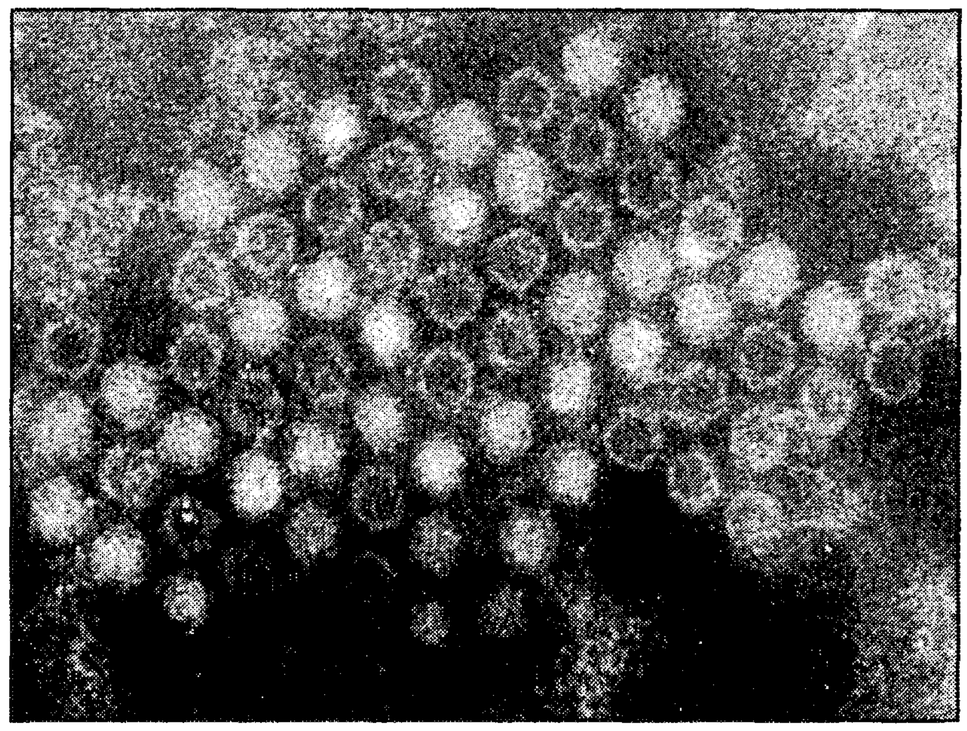
همزمان با برنامه جداسازی و تشخیص ویروس درمان حیوان نیز با توسل به الکترولیت تراپی و تجویز پنی سیلین، جنتامایسین و متوکلروپرامایدطی یک برنامه منظم انجام گرفت و روند بهبودی حیوان مذکور پس از ۳ روز آغاز گردید، رفع علایم اسهال و افزایش تعداد سلولهای سفید خون به ۱۲۰۰ درمیکرو لیتر و بویژه افزایش نوتروفیل ها به ۸۰۰ در میکرو لیتر از آن جمله بودند. در نهایت حیوان سلامت خود را طی چند روز پس از درمان بازیافت.

بحث

پارووویروس سگ قادر به آلوده کردن تمام سگهای زیر یکسال از هر جنس و نژاد می باشد، لذا کلیه سگهای مبتلا به اسهال زیر یکسال و فاقد سابقه واکسیناسیون از نظر این بیماری باید مورد بررسی قرار گیرند. با شروع حذف ایمنی مادری در ۲ ماهگی حساسیت حیوان به بیماری زیادتر شده و بروز بیماری همراه با اختلالات آب و الکترولیت می تواند حیوان را به سرعت به طرف مرگ بکشاند (۲،۵،۱۰).

با توجه به تاثیر ویروس بر سلولهای در حال میتوز از جمله سلولهای مغز استخوان و سلولهای کریپت در روده ها بروز لوکوپنی می تواند به عنوان یک شاخص اولیه، خصوصاً در شرایطی که آزمونهای ویروس شناسی و سرمی میسر نباشد به عنوان شاخصی مناسب در پیش بینی وضعیت بیماری مورد استفاده قرار گیرد (۵،۹).

در جداسازی پارووویروس ها نکته حایز اهمیت آن است که باید ویروس را به سلولهای در حال رشد و تکثیر اضافه نمود به همین منظور توصیه شده که نمونه های مرضی یا به کشتهای سلولی تک لایه تازه و یا تعلیق سلولهای آماده کشت اضافه گردند تا خللی در مراحل رشد و تکثیر آنها پیش نیاید. در برخی متون شانس جداسازی ویروس در کشت سلولی MDCK را کم دانسته اند ولی برخی محققین اصولاً جداسازی پارووویروس سگ را در این تیره سلولی به عنوان یک شاخص دقیق جهت معرفی جرم می دانند. به هر ترتیب به نظر می رسد نوعی تفاوت در تمایل بافتی ویژه در میان پارووویروس های سگ از نظر رشد و تکثیر تیره سلولی MDCK وجود داشته باشد. جهت تعیین تیپ پارووویروس های سگ معمولاً از آزمونهای بیولوژی ملکولی مثل



تصویر ۳ - تصویر میکروسکوپ الکترونی از پارووویروس جدا شده به روش رنگ آمیزی منفی.

PCR و تعیین نقشه محدودیت ژنومی استفاده می گردد که در این گزارش تعیین تیپ ویروس انجام نگرفته است ولی نظر به وفور بسیار زیادتر تیپ ۲ و جدا شدن آن در تیره سلولی MDCK به احتمال زیادتری به نظر می رسد که نمونه جدا شده متعلق به تیپ ۲ پارووویروس سگ باشد. جهت تشخیص قطعی موارد بیماری همزمان با آزمونهای جداسازی و شناسایی ویروس می توان از آزمونهای ردیابی پادگنهای ویروسی مثل الیزا و ایمونوبلاتینگ و PCRنیز استفاده نمود (۶،۹،۱۰).

References

1. Castra, AE. and Huchle, B.(1992): Veterinary Diagnostic Virology, Mosby Year Book, PP:134-136
2. Durigon, EL. Angelo, MJ. Jerez, JA. Tanaka, H. and Hagiwara, MK. (1987): Comparison of haemagglutination, isolation in cell culture, immunoelectroosmophoresis and immunoelectron microscopy in the diagnosis of canine parvovirus infection. Revista-de-Microbiologia., 18, 3: 205-210.
3. Ettinger, D. and Stephen, J. (2000): Tex Book of Veterinary Internal Medicine, 5th ed. WB Saunders Co., PP: 420-422.
4. Hudson, L. and Hay, F.C. (1989): Practical Immunology 3rd ed. Blackwell scientific publication PP:1-12
5. Macartney, L. McCandlish, IAP. Thompson, H. and Cornwell, HJC. (2000): Canine parvovirus enteritis 1: clinical, haematological and pathological features of experimental infection., 115, 9: 201-210.
6. Mochizuki, M. and Hashimoto,T. (1986): Growth of feline panleukopneia virus and canine parvovirus in vitro. Japanese Journal of Veterinary Science. 48, 4: 841-844.
7. Murphy, F. A. Gibbs, E.P. J. Horzinek, M.C. and Studdert, M.J. (1999): Veterinary Virology. 3rd ed. Academic Pres Ink. PP: 335-342.
8. Nelson, RW. (1994): Small AnimalInternal Medicine, 2rd ed. Mosby Inc. PP: 438
9. Senda, M. Ohishi, K. Hirayama, N. and Yamamoto, H. (1987): Detection of parvovirus in cell culture. Annual Report of the National Veterinary Assay Laboratory., 24: 11-12.
10. Truyen,U. and Parrish, CR. (1992): Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. Journal of Virology., 66, 9: 5399-5408.