



Evaluation of Rapid Slide Feline Erythrocyte Agglutination and Inhibition Assays for the Diagnosis of Canine Parvoviral Infection

Sima Nikkhah¹, Omid Madadgar², Hesameddin Akbarein³, Tarane Behniapour¹,
Ali Rahmanifar¹, Niloofar Zarifian¹, Iraj Ashrafi Tamai⁴, Mahan Bitaraf⁵, Elnaz Kamrani⁴,
Shahram Jamshidi⁶

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

³ Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

⁵ Small Animal Practitioner, Tehran, Iran

⁶ Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 15 Apr 2026, **Reciver in revised from:** 15 Jun 2026, **Accepted:** 21 Jun 2026, **Available online:** 22 Sep 2026

doi [10.22059/jvr.2025.389941.3489](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.389941.3489)

J Vet Res, Volume 81, Number 3, 2026, 213-225

Abstract

BACKGROUND: Canine parvovirus is one of the leading causes of mortality in puppies. Rapid diagnosis of this disease plays a key role in the timely initiation of treatment and reduction of complications and fatal outcomes. However, despite their high diagnostic power, standard diagnostic methods face limitations in resource-limited conditions. In addition, the dependence of hemagglutination-based assays on specific biological resources, such as porcine erythrocytes, has limited their practical application in many clinical and field environments. From a clinical perspective, the availability of rapid diagnostic methods capable of detecting parvoviral antigens in fecal samples while simultaneously assessing the host immune response can be beneficial for early therapeutic decision-making. Nevertheless, such methods cannot replace standard assays with higher sensitivity and reproducibility.

OBJECTIVES: This study aimed to develop and evaluate a slide agglutination test (SAT) for rapid detection of the virus in fecal samples and a slide inhibition test (SIT) for antibody detection in serum, as complementary and supportive tools alongside reference methods, particularly in resource-limited conditions. In this regard, feline erythrocytes were used as an accessible alternative to porcine erythrocytes.

METHODS: SAT and SIT were performed using feline and rhesus erythrocytes on 33 fecal samples that tested positive by a rapid immunochromatographic assay. The tests were conducted at three different temperatures (4, 25, and 37 °C). The performance of these methods was evaluated based on PCR and cell culture results as reference standards, and the agglutination activity under different conditions was compared.

RESULTS: The sensitivity and specificity of the SAT were estimated to be 92 % and 95%, respectively, and this assay showed close agreement with PCR results. The SIT was able to completely inhibit agglutination in all positive samples.

CONCLUSIONS: The use of feline erythrocytes instead of porcine erythrocytes reduces some common limitations and facilitates the field application of SAT and SIT. These methods are not intended to replace standard diagnostic assays with higher sensitivity and reproducibility, but rather can serve as auxiliary screening tools in resource-limited settings to support improved management of canine parvoviral infection.

Keywords: Canine parvovirus, Diagnosis, Feline erythrocyte, Hemagglutination, Infectious disease

Copyright © The Author(s). Publisher: University of Tehran Press Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Shahram Jamshidi, Tel/Fax: +9821-61117122



How to cite this article:

Nikkhah S, Madadgar O, Akbarein H, Behniapour T, Rahmanifar A, Zarifian N, Ashrafi Tamai I, Bitaraf M, Kamrani E, Jamshidi S. Evaluation of rapid slide feline erythrocyte agglutination and inhibition assays for the diagnosis of canine parvoviral infection. Journal of Veterinary Research. 2026;81(3):213-225 (In Persian). doi: 10.22059/jvr.2025.389941.3489

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Characteristics of parvovirus primers.

Table 2. Comparison of SAT and molecular assay based on cell culture results.

Figure 1. A schematic representation of inhibition of agglutination (column B) and agglutination (column A) by feline (row 1) and resus (row 2) erythrocytes.

Figure 2. Stepwise schematic of the SAT. Step 1: Dilute the fecal samples of the suspected cases 1:2 in PBS; Step 2: Add 50 μ L of the diluted sample onto each slide; Step 3: Add 50 μ L of a 3% erythrocyte suspension from feline (and rhesus); Step 4: Mix uniformly (at 4, 25, or 37 °C; neutral pH) and record the time of the agglutination onset and classify its intensity; Step 5: Result interpretation; homogeneous suspension = negative; Step 6: Result interpretation; non-homogeneous clumping = Positive.

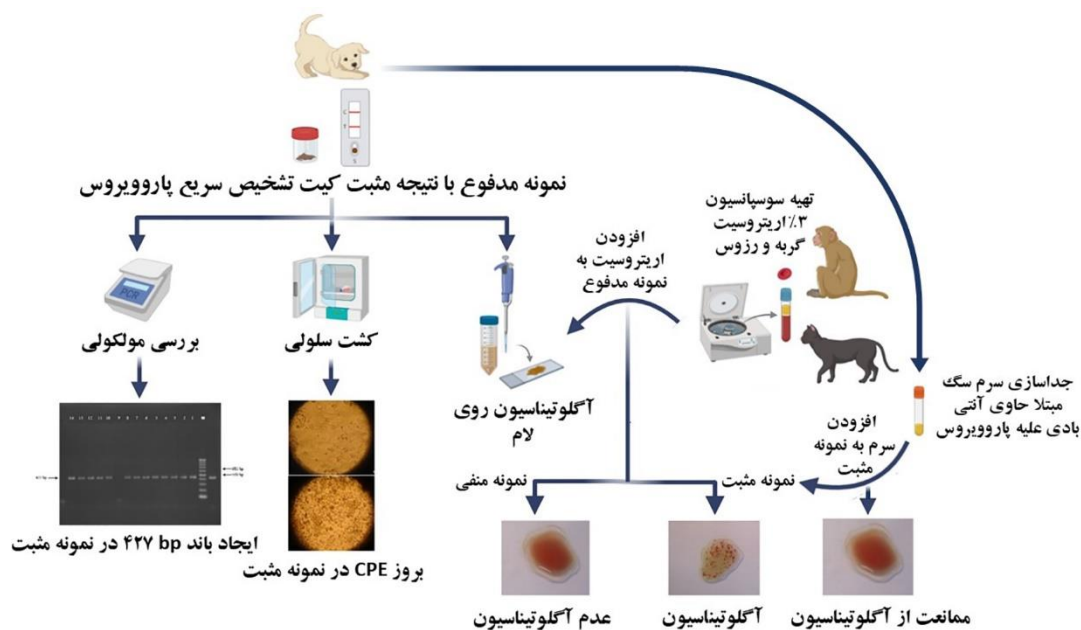
Figure 3. Stepwise schematic of the SIT: Steps 1-2: Dilute the positive fecal sample 1:2 in PBS; Step 3: Mix with 1:2 hyperimmune serum and incubate the mixture for 5 min at room temperature; Step 4: Add 50 μ L of a 3% erythrocyte suspension from feline (and, in parallel, rhesus); Step 5: mix uniformly (at 4, 25, or 37 °C; neutral pH); Step 6: result interpretation; homogeneous suspension = positive.

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of parvovirus—bands obtained with primer Pb (427 bp). M: 100-bp DNA marker. Lane 9: the sample with SAT-positive but negative cell culture. Lanes 1–8 and 10–14: samples with positive cell culture. Lane 12: positive control (Fortedog vaccine).

Highlight:

1. Feline erythrocytes were successfully used as an accessible alternative to porcine erythrocytes in slide agglutination–based assays for canine parvovirus detection.
2. The SAT showed good sensitivity (92%) and specificity (95%), with excellent agreement with PCR results.
3. The SIT effectively detected anti-CPV antibodies, demonstrating complete inhibition of agglutination in all positive samples.
4. SAT and SIT provided rapid, low-cost diagnostic support, suitable for use in resource-limited veterinary settings.
5. SAT and SIT are proposed as complementary screening tools in the diagnosis and management of canine parvoviral infection.

Graphical Abstract





ارزیابی روش‌های سریع آگلوتیناسیون اریتروسیت گربه و ممانعت آن روی لام برای تشخیص عفونت پاروویروسی سگ‌سانان

سیما نیکخواه^۱، امید مددگار^۲، حسام‌الدین اکبرین^۳، ترانه بهنیاپور^۱، علی رحمانی‌فر^۱، نیلوفر ظریفیان^۱، ایرج اشرفی‌تمای^۴، ماهان بیطرف^۵، الناز کامرانی^۴، شهرام جمشیدی^۶

^۱ دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی و ژنتیک مولکولی، دانشگاه میشیگان، لنسینگ شرقی، میشیگان، ایالات متحده آمریکا، آمریکا

^۳ گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۴ دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۵ متخصص داخلی بخش خصوصی، تهران، ایران

^۶ گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۶ فروردین ۱۴۰۵، تاریخ بازنگری: ۲۵ خرداد ۱۴۰۵، تاریخ پذیرش: ۳۱ خرداد ۱۴۰۵، تاریخ انتشار: ۳۱ شهریور ۱۴۰۵

doi: [10.22059/jvr.2025.389941.3489](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.389941.3489)

دوره ۸۱، شماره ۳، ۱۴۰۵، ۲۲۵-۲۱۳

چکیده

زمینه مطالعه: پاروویروس سگ‌سانان یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در توله‌سگ‌ها می‌باشد. تشخیص سریع این بیماری نقش کلیدی در آغاز درمان به‌موقع و کاهش عوارض و تلفات دارد. با این حال روش‌های تشخیصی استاندارد موجود با وجود قدرت تشخیصی بالا، در شرایط کم‌امکانات با محدودیت مواجه می‌باشند. علاوه بر این وابستگی آزمون‌های هم‌آگلوتیناسیون به منابع بیولوژیک خاص، مانند اریتروسیت خوک، کاربرد عملی آن‌ها را در بسیاری از محیط‌های بالینی و میدانی محدود کرده است. از نظر بالینی، وجود روش‌های تشخیصی سریع که بتوانند آنتی‌ژن پاروویروس را در نمونه‌های مدفوع شناسایی کرده و هم‌زمان امکان بررسی پاسخ ایمنی میزبان را فراهم کنند، می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های اولیه درمانی مفید باشد. با این حال چنین روش‌هایی نمی‌توانند جایگزین آزمون‌های استاندارد با حساسیت و تکرارپذیری بالا شوند.

هدف: هدف از مطالعه حاضر، توسعه و ارزیابی آزمون آگلوتیناسیون روی لام (SAT) برای تشخیص سریع ویروس در نمونه‌های مدفوع و آزمون ممانعت از آگلوتیناسیون (SIT) برای شناسایی پادتن در سرم، به‌عنوان ابزارهای کمکی و مکمل در کنار روش‌های مرجع، به‌ویژه در محیط‌های با منابع محدود بود. در این راستا، از اریتروسیت‌های گربه به‌عنوان جایگزینی در دسترس به‌جای اریتروسیت خوک استفاده شد.

روش کار: آزمون‌های SAT و SIT با استفاده از اریتروسیت‌های گربه و رزوس روی ۳۳ نمونه مدفوع با نتیجه مثبت در کیت سریع ایمونوکروماتوگرافی انجام شد. آزمون‌ها در ۳ دمای ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد اجرا شد. عملکرد این روش‌ها براساس نتایج PCR و کشت سلولی به‌عنوان استاندارد مرجع ارزیابی و میزان فعالیت آگلوتیناسیون در شرایط مختلف مقایسه شد.

نتایج: حساسیت و ویژگی آزمون SAT به‌ترتیب ۹۲ و ۹۵ درصد برآورد شد و این آزمون تطابق نزدیکی با نتایج PCR نشان داد. آزمون SIT نیز در تمام نمونه‌های مثبت قادر به ممانعت کامل از آگلوتیناسیون بود.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد استفاده از اریتروسیت گربه به‌جای خوک، برخی محدودیت‌های رایج را کاهش داده و کاربرد میدانی آزمون‌های SAT و SIT را تسهیل می‌کند. این روش‌ها نه به‌عنوان جایگزین آزمون‌های استاندارد با حساسیت و تکرارپذیری بالاتر، بلکه به‌عنوان ابزارهای غربالگری کمکی در محیط‌های با امکانات محدود می‌توانند در مدیریت بهتر عفونت پاروویروسی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: اریتروسیت گربه، بیماری عفونی، پاروویروس سگ‌سانان، تشخیص، هم‌آگلوتیناسیون

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: شهرام جمشیدی، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

پاروویروس سگ‌سانان از مهم‌ترین عوامل گاستروآنتریت شدید در سگ‌سانان اهلی و وحشی سراسر جهان می‌باشد که به‌طور قابل توجهی سلامت و بقای آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). این ویروس کوچک و بدون پوشینه متعلق به خانواده پاروویریده و دارای دو تیپ CPV-1 و CPV-2 است. از سال ۱۹۷۲ و همه‌گیری CPV-2، این ویروس دچار تغییرات آنتی‌ژنیک متعددی شد. در حال حاضر سه تیپ CPV-2a، CPV-2b و CPV-2c جانشین واریانت آنتی‌ژنیک اصلی شده‌اند. در ایران نخستین گزارش جداسازی پاروویروس سگ‌سانان در سال ۲۰۰۲ توسط Hemmatzadeh و Jamshidi انجام شد (۲). در حال حاضر طبق مطالعات انجام‌شده سویه غالب در گردش ایران CPV-2a گزارش شده است (۳، ۴). این بیماری که با علائمی، از جمله استفراغ شدید، اسهال خونی، دهیدراتاسیون و حتی سرکوب ایمنی شناخته می‌شود، به‌طور خاص در سگ‌های غیرواکسینه و توله‌ها، مرگومیر بالایی را رقم می‌زند (۵، ۶). پاروویروس به‌علت فقدان پوشینه، در برابر مواد ضد عفونی‌کننده مقاومت بالایی دارد و در محیط بسیار پایدار است (۷). همگامی این ویژگی با دفع مقادیر زیاد ویروس توسط توله‌های مبتلا، انتقال آن را به‌ویژه در محیط‌هایی مانند مراکز پرورش و نگهداری بسیار میسر کرده است. تشخیص زودهنگام این بیماری می‌تواند در مدیریت درست و به‌موقع آن مؤثر واقع شود. روش‌های آزمایشگاهی متعددی برای تشخیص این بیماری از جمله جداسازی ویروس، روش مولکولی (PCR) و روش‌های ایمنی‌شناختی (الایزا و ایمونوفلورسانس) و میکروسکوپ الکترونی به کار گرفته می‌شود. با این حال این روش‌های تشخیصی با محدودیت‌های قابل توجهی، از جمله نیاز به تجهیزات پیشرفته، زیرساخت‌های آزمایشگاهی تخصصی، نیروی انسانی مجرب و فرایندهای زمان‌بر و تحمیل هزینه‌های زیاد همراه می‌باشند (۸). البته روش‌های دیگری، از جمله ایمونوکروماتوگرافی، هم‌آگلوتیناسیون و ممانعت از آن، آزمون آگلوتیناسیون لاتکس و آزمون آگلوتیناسیون همراه نیز برای تشخیص سریع این ویروس طراحی شده‌اند. با وجود این، گاه عدم دسترسی به مواد مورد نیاز و یا نبود صرفه اقتصادی در جمعیت زیاد، در بسیاری از موارد به عدم مدیریت به‌موقع و شیوع مقطعی این ویروس، به‌خصوص در مراکز پرورش و نگهداری سگ‌ها منجر شده است (۸، ۹). روش آگلوتیناسیون روی لام که از روش هم‌آگلوتیناسیون اقتباس شده است، با تکیه بر توانایی پاروویروس در آگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز به تشخیص آن می‌پردازد (۱۰). گلبول‌های قرمز تازه خوک بالاترین حساسیت و سازگاری را برای آزمایش آگلوتیناسیون ارائه می‌دهند، اما به‌علت محدودیت دسترسی در کشورهای اسلامی، انجام مطالعه روی آن‌ها میسر نیست (۱۱). از آنجاکه در بسیاری از کشورها محدودیتی برای استفاده از خون خوک در آزمون آگلوتیناسیون وجود ندارد، مطالعات اندکی در زمینه به‌کارگیری اریتروسیت سایر پستانداران انجام شده است. برای رفع این محدودیت، در مطالعه حاضر از اریتروسیت گربه که به‌مراتب در دسترس‌تر است، به‌منظور انجام آگلوتیناسیون روی لام استفاده شده است.

مواد و روش کار

حیوانات تحت مطالعه: مطالعه حاضر بر روی ۳۳ قلاده سگ زیر ۱ سال، در نژادهای مختلف که با علائم بالینی مشکوک به عفونت پاروویروسی شامل استفراغ، اسهال، بی‌اشتهایی و بی‌حالی به بیمارستان ارجاع داده شده بودند، انجام گرفت. برای غربالگری اولیه، از کیت‌های سریع ایمونوکروماتوگرافی ساخت شرکت Quicking Biotech استفاده شد. آزمون براساس دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد. به این ترتیب که مقدار کمی از نمونه مدفوع تازه در بافر استخراج کیت، سوسپانسیون شده و سپس ۲ تا ۳ قطره از محلول به چاهک تست ریخته شد. نتیجه آزمون پس از ۵ تا ۱۰ دقیقه براساس ظاهر شدن خطوط رنگی در ناحیه کنترل و آزمون خوانده شد. نمونه‌هایی که در آن‌ها هر دو خط ظاهر شدند، به‌عنوان مثبت و نمونه‌هایی که فقط خط کنترل داشتند، به‌عنوان منفی در نظر گرفته شدند. تنها سگ‌هایی که نتیجه کیت تشخیص سریع آن‌ها مثبت بود، برای بررسی‌های بعدی با روش آگلوتیناسیون روی لام و آزمون ممانعت از آگلوتیناسیون وارد مطالعه حاضر شدند.

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی: برای انجام آزمایش آگلوتیناسیون، نمونه مدفوع تازه به‌وسیله یک سواب استریل، از ناحیه راست روده حیوانات مشکوک به عفونت جمع‌آوری شد و پس از تهیه سوسپانسیون ۱۰ درصد با بافر فسفات سالین (pH=۷/۲)، به‌منظور حذف ذرات معلق سانتریفیوژ شد و مایع رویی از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و نمونه حاصل در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای انجام آزمون ممانعت از آگلوتیناسیون (SIT)، به سرم‌های دارای آنتی‌بادی اختصاصی نیاز بود. از این‌رو سرم از سگ‌هایی تهیه شد که عفونت آن‌ها به‌طور قطعی با روش PCR تأیید شده بود تا سرم‌های هایپرایمیون لازم برای انجام SIT با دقت

کافی فراهم شود. نمونه‌های خون از ورید سفالیک در لوله‌های فاقد ماده ضدانعقاد جمع‌آوری، سپس با سرعت $g \times 1200$ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم‌های حاصل تا زمان انجام آزمون در دمای 20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمایش آگلوتیناسیون روی لام: این آزمایش براساس روش کار پیشنهادی Marulappa و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد (۱۰). بدین‌منظور در روز موردنظر، ۱ میلی‌لیتر خون از ۱ گربه و ۱ میمون رزوس سالم که به بیمارستان مراجعه کرده بودند در لوله دارای ماده ضدانعقاد آلسور اخذ و برای جداسازی گلبول‌های قرمز، ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی شست‌وشو و سانتریفیوژ شد. در هر مرتبه، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $g \times 2000$ سانتریفیوژ شدند و پس از هر بار سانتریفیوژ، مایع رویی به دقت دور ریخته شد و رسوب گلبول‌های قرمز مجدداً با سرم فیزیولوژی مخلوط گردید و از رسوب حاصل از شست‌وشوی مرتبه سوم، سوسپانسیون ۳ درصد از گلبول قرمز تهیه شد (۱۱). رقت ۱:۲ از نمونه‌های مدفوعی موردبررسی، در بافر فسفات سالین تهیه شد. برای ارزیابی آگلوتیناسیون، روی دو لام شیشه‌ای مجزا ۵۰ میکرولیتر از نمونه مدفوع، در دمای 25°C درجه سانتی‌گراد (محیط) قرار داده شد و همه این مراحل در دماهای ۴ (یخچال) و 37°C درجه سانتی‌گراد (داخل انکوباتور) نیز برای تمام نمونه‌ها تکرار شد. در هر سه حالت، به یکی از لام‌ها ۵۰ میکرولیتر خون گربه سالم و به لام دیگر ۵۰ میکرولیتر خون میمون رزوس سالم اضافه شد. نمونه مدفوع و خون قرارگرفته بر روی هر لام با استفاده از همزن به مدت ۳۰ ثانیه به‌طور یکنواخت مخلوط شدند. زمان لازم از لحظه مخلوط شدن تا شروع آگلوتیناسیون برای هر نمونه خون در هریک از دماها با دقت برحسب ثانیه ثبت و همچنین شدت آگلوتیناسیون نیز با نور چراغ مطالعه ارزیابی شد. در ثبت نتایج، مواردی به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شدند که آگلوتیناسیون به‌صورت تشکیل ذرات غیرهمگن آشکار بود؛ در مقابل، نمونه‌هایی که خون ترکیب‌شده با نمونه مدفوعی پس از گذشت ۱۰ دقیقه همگن باقی مانده و هیچ اثری از آگلوتیناسیون نشان ندادند، به‌عنوان موارد منفی در نظر گرفته شدند (تصویر ۱). نمایی شماتیک از روش انجام آزمون آگلوتیناسیون روی لام قابل‌مشاهده است (تصویر ۲-۲A).

آزمون ممانعت از آگلوتیناسیون: برای آزمایش ممانعت از آگلوتیناسیون، از سرم هایپرایمیون سگ‌های مبتلا به پاروویروس تأییدشده با روش مولکولی استفاده شد. نمونه خون دام‌های موردنظر از ورید سفالیک در لوله‌های فاقد ماده ضدانعقاد جمع‌آوری شد. نمونه‌های مذکور به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت $g \times 3000$ سانتریفیوژ شدند. سرم‌های جداشده در فریزر با دمای 20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا برای آزمایش استفاده شوند. برای بررسی ممانعت از آگلوتیناسیون، روی لام شیشه‌ای ۵۰ میکرولیتر از نمونه مدفوع با محلول PBS به نسبت ۱:۲ رقیق شد و با ۵۰ میکرولیتر از سرم هایپرایمیون با رقت ۱:۲ مخلوط گردید. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۳ درصد اریتروسیت گربه و اریتروسیت رزوس به مخلوط اضافه شد. این ترکیبات در دماهای 25°C ، 37°C و 4°C درجه سانتی‌گراد برای مشاهده مهار آگلوتیناسیون توسط سرم هایپرایمیون بررسی شدند. عدم رخداد پدیده آگلوتیناسیون و باقی ماندن نمونه محلول به‌صورت هموزن، به‌عنوان نتیجه مثبت این آزمون تلقی شدند (تصویر ۱). نمایی شماتیک از روش انجام آزمون ممانعت از آگلوتیناسیون روی لام قابل‌مشاهده است (تصویر ۲-۲B).

برای ارزیابی صحت عملکرد و دقت نتایج، یک بار از PBS استفاده‌شده در رقیق‌سازی، به‌عنوان کنترل منفی و یک بار از نمونه‌ای که حضور پاروویروس تحت تیپ b2 در آن از طریق کشت سلولی و PCR تأیید شده بود، به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. این کنترل‌ها به‌صورت هم‌زمان در هر دو آزمایش به کار گرفته شدند تا اعتبار آزمون تضمین شود.

کشت سلولی: سلول‌های دودمان MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cell line) برای جداسازی ویروس استفاده شدند. این سلول‌ها که از بخش ویروس‌شناسی انستیتو پاستور ایران به شکل کرایوتیوب‌های مخصوص تهیه شده بودند، از تانک ازت دارای ازت مایع خارج و بلافاصله به انکوباتور 37°C درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا از حالت انجماد خارج شوند. سپس سلول‌ها در محیط استوکر دارای ۱۰ تا ۱۵ درصد سرم جنین گوساله و کوکتل پنی‌سیلین + استرپتومایسین کشت داده شدند. پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها به‌منظور تکثیر و پاساژ آماده شدند. محیط کشت قبلی تخلیه شد و سلول‌ها با تریپسین ۰/۲۵ درصد تیمار و پس از جداسازی، در فلاسک‌های جدید با تراکم مناسب کشت داده شدند. رشد سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی شد. حدود نیم تا ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های ویروسی پس از سانتریفیوژ و عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون در فلاسک‌های دارای سلول‌های MDCK و محیط کشت RPMI1640 تلقیح شدند. سپس فلاسک‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور 37°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا ویروس به سلول‌ها متصل شود. پس از آن سلول‌ها شسته شدند و محیط نگهداری ارل ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به

آن‌ها اضافه شد. فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. مدت‌زمان انکوباسیون هر پاساژ ۴۸ ساعت بود و آسیب سلولی (CPE) هر ۱۰ تا ۱۵ ساعت با میکروسکوپ بررسی شد. نمونه‌هایی که طی سه پاساژ متوالی، هیچ‌گونه CPE، از جمله گرد شدن و جداسازی نشان ندادند، به‌عنوان نمونه منفی در نظر گرفته شدند.

بررسی مولکولی: برای استخراج DNA، ابتدا سوسپانسیون ۲۰ درصدی از نمونه‌های مدفوع با استفاده از سرم فیزیولوژی در شرایط استریل تهیه شد و سپس با استفاده از کیت Bioneer ساخت کره جنوبی طبق دستورالعمل سازنده استخراج انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده به‌منظور تشخیص و تعیین تیپ ویروس شامل p2 برای تشخیص CPV-2، p_b برای تیپ CPV-2b و p_{ab} برای تیپ‌های CPV-2a و CPV-2b توسط شرکت سیناژن ایران طراحی شدند (جدول ۱) (۱۲، ۱۳). در مرحله بعد ۸ میکرولیتر از ONE STEP PCR PRE mix داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس ۲ میکرولیتر پرایمر فرورارد و Reverse داخل میکروتیوب ریخته شد و سپس ۲ میکرولیتر از محصول به‌دست‌آمده از استخراج DNA اضافه شد و ترکیب حاصل با آب مقطر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR در دستگاه Thermal Cycler (BIO-RAD T100™) انجام شد. شرایط برنامه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه متوالی، شامل واسرشت (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال (۶۱/۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه) و طولیل‌سازی (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه) بود. در پایان یک مرحله طولیل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۵). محصولات نهایی PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با سایبرسیف، توسط دستگاه Trans eliminator بررسی شدند. اندازه قطعات تکثیرشده براساس پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱، برای تیپ‌های مختلف ویروس مورد انتظار بود.

جدول ۱. خصوصیات پرایمرهای پاروویروس.

نام پرایمر	منابع	توالی پرایمر	اندازه قطعه تکثیر یافته
p _b	Pereira و همکاران ۲۰۰۰	(f): (CTTTAACCCTTCCTGTAACAG) (r): (CATAGTTAAATTGGTTATCTAC)	۴۲۷bp
p2	Pereira و همکاران ۲۰۰۰	(f): (GAAGAGTGGTTGTAAATAATA) (r): (CCTATATCACCAAAGTTAGTAG)	۶۸۱bp
p _{ab}	Senda و همکاران ۱۹۹۵	(f): (GAAGAGTGGTTGTAAATAATT) (r): (CCTATATAACCAAAGTTAGTAG)	۶۸۱bp

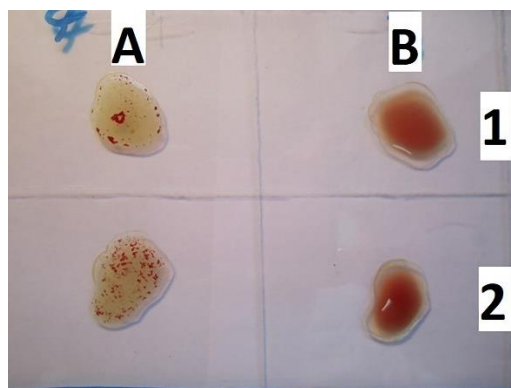
جدول ۲. مقایسه نتایج آزمون آگلوتیناسیون روی لام و روش مولکولی باتوجه به نتایج کشت سلولی.

کشت سلولی									
منفی		مثبت		تعداد کل		حساسیت		ویژگی	
ارزش پیش‌گویی منفی		ارزش پیش‌گویی مثبت		تعداد کل		حساسیت		ویژگی	
فراوانی نسبی (درصد)		فراوانی نسبی (درصد)		فراوانی مطلق		حساسیت		ویژگی	
آگلوتیناسیون روی لام									
مثبت	۳ درصد	۱	۳۶ درصد	۱۲	۱۳	۹۲ درصد	۹۵ درصد	۹۲ درصد	۹۵ درصد
منفی	۵۸ درصد	۱۹	۳ درصد	۱	۲۰				
تعداد کل	۶۱ درصد	۲۰	۳۹ درصد	۱۳	۳۳				
مثبت	۰ درصد	۰	۳۶ درصد	۱۲	۱۲				
روش مولکولی									
منفی	۶۱ درصد	۲۰	۳ درصد	۱	۲۱	۹۲ درصد	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد	۹۵ درصد
تعداد کل	۶۱ درصد	۲۰	۳۹ درصد	۱۳	۳۳				

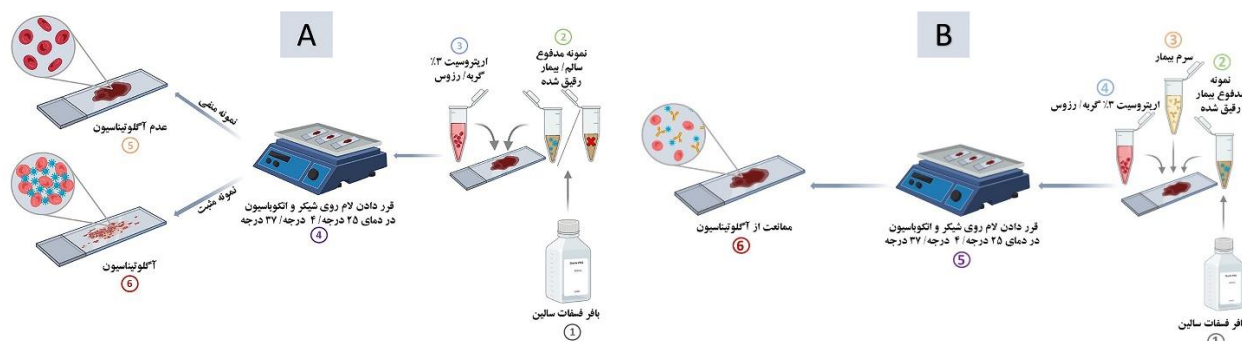
آزمون آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. برای یافتن رابطه بین متغیرهای کیفی با نتایج آزمون‌های تشخیصی از آزمون‌های مربع کای (Chi-square) و آزمون دقیق فیشر (Fisher's Exact test) استفاده شد. مقایسه زمان آگلوتیناسیون بین دماهای مختلف در خون گربه و رزوس با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تکمیلی (Post Hoc) توکی (Tukey) انجام شد. اختلاف زمان آگلوتیناسیون بین خون گربه و رزوس در دماهای مختلف با استفاده از آزمون t مستقل (Independent t test) انجام گرفت. حساسیت و ویژگی تست‌های تشخیصی نسبت به آزمون استاندارد طلایی (کشت) بررسی شد. برای مقایسه درجه همخوانی روش‌های مختلف تشخیصی از ضریب توافق کاپا (Kappa value) استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمون آگلوتیناسیون و مانعت از آگلوتیناسیون: از مجموع ۳۳ نمونه‌ای که در بررسی با کیت ایمنوکروماتوگرافی مثبت تشخیص داده شده بودند، ۱۳ نمونه در آزمون آگلوتیناسیون روی لام (SAT) مثبت تلقی شدند (جدول ۲). در تمام این موارد به جز یک نمونه، گلبول‌های قرمز میمون رزوس و گربه در هر سه دمای ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در کمتر از ۱ دقیقه آگلوتینه شدند و تنها در یک نمونه پیش‌تر اشاره شده، آگلوتیناسیون گلبول قرمز میمون رزوس طی ۶۰ ثانیه و گلبول قرمز گربه طی ۲ دقیقه رخ داد. در آزمون مانعت از آگلوتیناسیون (SIT) نیز در هر ۳۳ نمونه مورد بررسی، گلبول‌های قرمز به صورت هموزن و یکنواخت باقی ماندند و هیچ‌گونه آگلوتیناسیونی مشاهده نشد. تحلیل آماری نشان داد بین دماهای مختلف یا مدت‌زمان‌های آگلوتیناسیون، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$).



تصویر ۱. نمایی از مانعت از آگلوتیناسیون (ستون B) و آگلوتیناسیون (ستون A) توسط اریتروسیت گربه (ردیف ۱) و رزوس (ردیف ۲).



تصویر ۲. A. نمای گام به گام از SAT: (۱) رقیق‌سازی نمونه مدفوع مشکوک با PBS به نسبت ۱:۲؛ (۲) افزودن ۵۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده روی هر لام؛ (۳) افزودن ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۳ درصد اریتروسیت گربه (و به طور موازی رزوس)؛ (۴) مخلوط کردن یکنواخت (دمای ۴، ۲۵ یا ۳۷ درجه سانتی‌گراد؛ pH خنثی) و ثبت زمان تا شروع آگلوتیناسیون و ارزیابی شدت؛ تفسیر نتیجه: (۵) همگن ماندن سوسپانسیون = منفی، (۶) تشکیل ذرات ناهمگن = مثبت. **B. نمای گام به گام از SIT:** (۱ و ۲) رقیق‌سازی نمونه مدفوع مثبت با PBS به نسبت ۱:۲؛ (۳) مخلوط کردن با سرم هایپرایمیون ۱:۲ و انکوباسیون مخلوط به مدت ۵ دقیقه

در دمای محیط؛ (۴) افزودن ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۳ درصد اریتروسیت گربه (و به طور موازی رزوس)؛ (۵) مخلوط کردن یکنواخت (دمای ۰.۴ یا ۳۷ درجه سانتی گراد؛ pH خنثی)؛ تفسیر نتیجه: (۶) همگن ماندن سوسپانسیون = مثبت.



تصویر ۳. ژل الکتروفورز پاروویروس - باندهای حاصل از پرایمر P_b با سایز ۴۲۷ جفت باز - M: مارکر ۱۰۰ جفت باز. چاهک - ۹. نمونه‌ای که در روش SAT نتیجه مثبت داشت، اما در روش کشت سلولی منفی بود، در این روش نیز ایجاد افزوده نکرد. چاهک ۸- و ۱۰-۱۴ نمونه‌های با نتیجه مثبت در کشت سلولی. چاهک ۱۲: کنترل مثبت واکسن Fortedog.

کشت سلولی: کشت ویروس بر روی سلول‌های MDCK به عنوان روش استاندارد طلایی تشخیص انجام شد. از ۳۳ نمونه بررسی شده، ۱۳ نمونه آثار سایتوپاتیک نشان دادند. در این میان یک نمونه که نتیجه آزمون SAT آن منفی بود، اثرات سایتوپاتیک ایجاد کرد. همچنین یک نمونه که در آزمون SAT نتیجه مثبت داشت، در کشت ویروس هیچ گونه آثار سایتوپاتیکی نشان نداد.

بررسی مولکولی: در بررسی مولکولی با استفاده از PCR هیچ یک از نمونه‌های مورد آزمایش با پرایمر P_{ab} و P₂ هیچ گونه افزوده‌ای را نشان ندادند. ۱۲ نمونه از ۳۳ نمونه و نمونه کنترل مثبت با واکسن Fortedog با پرایمر P_b افزوده‌هایی با سایز باند ۴۲۷ جفت باز تولید کردند (تصویر ۳). تمام نمونه‌های مثبت در آزمون PCR، در آزمون SAT نیز موجب آگلوتینه شدن گلبول‌های قرمز شدند. تنها یک نمونه که در آزمون SAT نتیجه مثبت داشت، در PCR نیز مانند کشت سلولی نتیجه منفی ارائه کرد و هیچ باندهایی تولید نشد (تصویر ۳). چاهک شماره ۹). همچنین یک نمونه از ۱۳ نمونه مثبت در روش کشت سلولی، در روش مولکولی نتیجه منفی داشت. بدین ترتیب حساسیت و ویژگی آزمون PCR به ترتیب ۹۲ و ۱۰۰ درصد و ارزش‌های پیش‌گویی مثبت و منفی به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۵ درصد برآورد شدند (جدول ۲).

برآورد حساسیت و ویژگی SAT: با در نظر گرفتن روش کشت سلولی به عنوان روش استاندارد طلایی ۳۶ درصد موارد مثبت کیت ایمونوکروماتوگرافی، مثبت حقیقی بودند. باتوجه به این مهم، حساسیت و ارزش پیش‌گویی مثبت آزمون آگلوتیناسیون روی لام ۹۲ درصد و ویژگی و ارزش پیش‌گویی منفی ۹۵ درصد برآورد شدند (جدول ۲). همچنین آزمون PCR که روش معمول مورد استفاده در تشخیص درمانگاهی است درجه همخوانی (ضریب توافق) بالایی با نتایج آزمون آگلوتیناسیون روی لام ($Kappa\ value = 0.936$) داشت که بیانگر توافق عالی (Excellent agreement) بود و نشان داد با اطمینان خاطر در مواقع نیاز می‌توان این دو روش را به جای یکدیگر به کار برد.

بحث

عفونت پاروویروسی سگ‌سانان به عنوان یک چالش جهانی شناخته می‌شود. این بیماری به شدت مسری و اغلب کشنده است و به دلیل شباهت علائم بالینی آن به سایر بیماری‌های گوارشی، تشخیص به موقع آن نقشی حیاتی در کنترل بیماری و نجات حیوان ایفا خواهد کرد (۱۴، ۱۵). در مطالعه حاضر، به توسعه و ارزیابی روش‌های سریع آگلوتیناسیون روی لام و ممانعت از آن، با استفاده از اریتروسیت گربه در تشخیص عفونت پاروویروسی سگ‌سانان، به عنوان روشی کارآمد و مقرون به صرفه پرداخته شد (۱۶).

روش‌های ایمونوکروماتوگرافی به صورت گسترده به عنوان ابزار تشخیصی اولیه عفونت‌های پاروویروسی سگ‌سانان استفاده می‌شوند (۹، ۱۷). یکی از در دسترس‌ترین انواع آن، کیت‌های ردیابی آنتی‌ژن پاروویروس در مدفوع می‌باشند که علاوه بر صرفه اقتصادی و ارائه سریع نتیجه، ویژگی بالایی دارند و به همین دلیل مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند؛ اما باین حال فاقد حساسیت قابل قبول می‌باشند. از محدودیت‌های این کیت‌ها، کیفی بودن نتایج ارائه شده است که گاهی متکی به استنباط فردی شخص انجام‌دهنده نیز می‌باشد. علاوه بر آن طبق مطالعه Decaro و همکاران در سال ۲۰۰۹، این روش تنها قابلیت تشخیص نمونه‌هایی را دارد که تیترو ویروسی آن‌ها بیش از ۱۰^۵ در هر میلی گرم مدفوع باشد (۱۸). این کیت‌ها با وجود هزینه نسبی پایین، در مواردی که تعداد نمونه‌های بسیار زیاد باشد، مانند محل پرورش و نگهداری سگ‌ها، هزینه بالایی را تحمیل می‌کنند.

کیت‌های الایزا برای تشخیص آنتی‌ژن و آنتی‌بادی پاروویروس سگ‌سانان به صورت گسترده تحت بررسی قرار گرفته‌اند. این کیت‌ها با وجود حساسیت و ویژگی تشخیصی بالا، محدودیت‌هایی برای استفاده در حجم بالا دارند. حتی کیت‌های الایزا سریع با دوره انکوباسیون کوتاه (۵ تا ۱۰ دقیقه) نیز به علت نیاز به مراحل شست‌وشوی متعدد و نیروی مجرب، هزینه‌بر و زمان‌بر می‌باشند.

آزمون PCR به عنوان یکی از حساس‌ترین روش‌ها برای شناسایی ویروس قلمداد شده است. این آزمون، به دلیل حساسیت و ویژگی بالا، به عنوان روش انتخابی برای تأیید پاروویروس سگ‌سانان مطرح شده است. هرچند نیاز به وسایل و تجهیزات گران‌قیمت و پرسنل متخصص، استفاده روزمره از این روش را محدود به مراکز تحقیقاتی کرده است (۱۹، ۲۰).

کشت سلول از روش‌های دقیق برای تشخیص عفونت پاروویروس سگ‌ها محسوب می‌شود و به عنوان تست استاندارد طلایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش کشت سلولی توانایی تشخیص کمترین مقادیر ویرونی را نیز داراست. باین حال این روش نیازمند محیط‌های کشت اختصاصی و امکانات آزمایشگاهی خاص بوده و تنها توسط افراد مجرب انجام پذیر است. همچنین دوره انکوباسیون این روش ۵ تا ۱۰ روز به طول می‌انجامد و در استفاده بالینی کارآمد نیست.

آزمون‌های مبتنی بر آگلوتیناسیون برای تشخیص پاروویروس سگ‌سانان از سال ۱۹۷۸ مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۱). هماگلوتینین نوعی پروتئین سطحی است که در هر ویروس تمایل اتصال به گیرنده‌های سطحی اریتروسیت گونه‌های خاصی را دارد و سبب جمع‌شدگی گلبول‌های خونی آن می‌گردد (۲۱). پاروویروس سگ‌سانان نیز توانایی اتصال به گیرنده‌های سطحی گلبول‌های قرمز خوک، میمون رزوس، گربه، سگ، موش صحرایی، گوسفند، همستر سوری، خرگوش و مرغ را دارد (۲۲-۲۶). دلیل این امر، احتمالاً وجود گیرنده‌های اختصاصی این ویروس بر سطح گلبول‌های قرمز گونه‌های مذکور و تمایل ذاتی ویروس برای اتصال و آگلوتینه کردن این سلول‌ها است. با عنایت به این ویژگی ذاتی پاروویروس سگ‌سانان، تست‌های مبتنی بر آگلوتیناسیون برای تشخیص پاروویروس سگ‌سانان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از جمله روش‌های مورد مطالعه، می‌توان به هماگلوتیناسیون و آگلوتیناسیون روی لام اشاره کرد. به منظور ساده‌سازی و افزایش سرعت، از ذرات لاتکس پوشیده‌شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نیز استفاده می‌شود (۲۷). تمام این آزمون‌ها برای تشخیص آنتی‌ژن پاروویروس مفید ارزیابی شده‌اند، اما به صورت تجاری در دسترس نمی‌باشند یا قابلیت بازتولید برای تمام تحت تیپ‌ها را ندارند و تاکنون بیشتر به مصارف پژوهشی رسیده‌اند؛ بنابراین روش‌هایی نیاز است که بتوانند همه ژنوتیپ‌ها و انواع آنتی‌ژنی پاروویروس را به منظور استفاده‌های بالینی و میدانی، تشخیص دهند. عوامل متعددی می‌توانند حساسیت و ویژگی آزمون هماگلوتیناسیون و مهار هماگلوتیناسیون را تحت تأثیر قرار دهند؛ این عوامل شامل اسیدیته، دما، استفاده از گلبول‌های قرمز خون از گونه‌های مختلف جانوری، غلظت گلبول‌های قرمز و حضور آگلوتینین‌های غیراختصاصی در سرم یا مهارکننده‌های هماگلوتیناسیون می‌باشند. علاوه بر این جهش‌های موجود در کپسید سویه‌های مختلف پاروویروس سگ می‌توانند فعالیت هماگلوتیناسیون را به شکل متغیری تحت تأثیر قرار دهند (۲۲).

پاسخ‌دهی آزمون هماگلوتیناسیون (HA) به طور معمول ۲ تا ۴ ساعت زمان می‌برد. به همین منظور برای افزایش سرعت و سهولت در تشخیصی پاروویروس، آزمون هماگلوتیناسیون به روش سریع‌تر و ساده‌تری به نام آزمون آگلوتیناسیون روی لام (SAT) اصلاح شده است. این روش ضمن حفظ دقت و اعتبار، امکان دریافت سریع‌تر نتایج را فراهم می‌کند (۱۰).

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های آزمون آگلوتیناسیون روی لام، همانند تست هماگلوتیناسیون، توانایی ارائه نتایج کمی با استفاده از آزمون‌های ممانعت از آگلوتیناسیون، در سنجش میزان آنتی‌بادی‌های ضدپاروویروس سگ‌سانان است. در دوره حساس ۶ تا ۸ هفتگی،

زمانی که آنتی‌بادی‌های مادری به تدریج کاهش می‌یابند و توله‌سگ‌ها در برابر عفونت آسیب‌پذیر می‌شوند، این تست می‌تواند به‌طور مؤثری کاهش آنتی‌بادی‌ها را شناسایی کرده و زمان بهینه واکسیناسیون را تعیین کند. این ویژگی به‌خصوص در مراکز پرورش و نگهداری سگ‌ها که نیاز به پایش مداوم وضعیت ایمنی تعداد زیادی از توله‌سگ‌ها وجود دارد، بسیار کاربردی است و به اتخاذ تصمیمات دقیق‌تر در زمان‌بندی واکسیناسیون کمک می‌کند (۱۰).

البته با توجه به اینکه روش آگلوتیناسیون روی لام، از آزمون هم‌آگلوتیناسیون اقتباس شده است، استفاده از خون تازه خوک، به‌عنوان منبع اریتروسیت پیشنهاد شده است؛ با توجه به عدم دسترسی به گلبول قرمز خوک و به دلیل لزوم استفاده از اریتروسیت‌های تازه و عدم امکان منجمد و ذخیره‌سازی آن‌ها، در مطالعه حاضر برای نخستین بار از گلبول‌های قرمز گربه، که دسترسی به آن به‌مراتب راحت‌تر می‌باشد، برای انجام آزمون آگلوتیناسیون روی لام در عفونت‌های پاروویروس سگ‌سانان استفاده شد. با توجه به نتایج مطالعه Senda و همکاران در سال ۱۹۸۶، خون رزوس توانایی آگلوتیناسیون مشابهی با خون خوک نشان می‌دهد (۲۳)؛ بدین منظور در مطالعه حاضر از خون رزوس، به‌عنوان اریتروسیت استاندارد، برای مقایسه با خون گربه استفاده شد. تمام موارد مثبت با خون رزوس در آزمون آگلوتیناسیون روی لام، با خون گربه نیز نتایج مثبت داشتند. همچنین تمام نمونه‌های مثبت در مدت‌زمان کمتر از ۱ دقیقه در هر ۳ دمای مورد بررسی (۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) آگلوتینه شدند و تفاوتی بین مدت‌زمان آگلوتیناسیون خون گربه و میمون رزوس وجود نداشت. این عدم تفاوت بیانگر قابلیت استناد به نتایج آزمون آگلوتیناسیون روی لام با استفاده از خون گربه در شرایط محیطی و امکانات مختلف است. با این حال در مطالعه Senda و همکاران در سال ۱۹۸۶ قدرت آگلوتیناسیون خون گربه یک‌چهارم خون رزوس اعلام شد که به علت کمی نبودن روش مورد استفاده در مطالعه حاضر، مقایسه امکان‌پذیر نبود (۲۳).

در مطالعه Bayati و همکاران در سال ۲۰۱۰ و مطالعات مشابه، نشان داده شد گلبول‌های قرمز پرنده‌گان به دلیل ساختار مناسب و حساسیت بالاتر، گزینه‌های بهتری برای تست هم‌آگلوتیناسیون CPV می‌باشند. گلبول‌های قرمز سایر گونه‌های پستانداران، مانند خوک و میمون نیز عملکرد خوبی داشته‌اند، اما گلبول‌های قرمز اسب به دلیل رفتار متناقض، کاربرد محدودی در این آزمون دارند. این یافته‌ها اهمیت انتخاب مناسب گونه گلبول قرمز برای افزایش دقت و حساسیت آزمایش را نشان می‌دهد (۱۱، ۲۶). از منظر اعتبار روش‌های تشخیصی پاروویروس سگ‌سانان، طبق مطالعات Decaro و همکاران در سال ۲۰۰۹، کشت سلولی به‌عنوان استاندارد طلایی، بالاترین حساسیت و ویژگی را دارد. نتایج مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی روش PCR را به ترتیب ۹۲ و ۱۰۰ درصد نشان داد. این در حالی است که مطالعات Mochizuki و همکاران در سال ۱۹۹۳ حساسیت و ویژگی این روش را در محدوده ۹۸ تا ۱۰۰ درصد گزارش کرده است. همچنین این روش را به‌عنوان یکی از دقیق‌ترین روش‌ها، در رتبه دوم پس از کشت سلولی معرفی کرده‌اند. مغایرت مشاهده شده بین نتایج قدرت تشخیصی PCR در مطالعه حاضر و مطالعات پیشین می‌تواند به عواملی همچون کیفیت نمونه‌ها، طراحی پرایمرها، شرایط انجام آزمایش یا تفاوت در جمعیت هدف مطالعه مرتبط باشد (۲۸). همچنین در مطالعه Decaro و همکاران در سال ۲۰۰۹، در رتبه سوم روش الایزا با حساسیت ۸۵ تا ۹۵ درصد و ویژگی ۹۰ تا ۹۵ درصد در نظر گرفته شد. در نهایت روش ایمونوکروماتوگرافی با حساسیت پایین‌تر (۶۰ تا ۷۰ درصد) و ویژگی ۹۰ تا ۹۵ درصد کمتر به صورت گسترده استفاده می‌شود (۱۸). مطالعه Saini و همکاران در سال ۲۰۲۴ نیز روش‌های ایمونوکروماتوگرافی (حساسیت ۸۳/۳ درصد و ویژگی ۹۲/۳ درصد) و تست پادتن درخشان (حساسیت ۶۶/۷ درصد و ویژگی ۸۴/۶ درصد) را با PCR مقایسه کردند (۲۹). براساس مطالعه‌های صورت گرفته، آگلوتیناسیون روی لام نسبت به هم‌آگلوتیناسیون ویژگی پایین‌تری دارد، اما از حساسیت یکسانی برخوردار است (۱۰). در مطالعه حاضر، روش آگلوتیناسیون روی لام با حساسیت ۹۲ درصد و ویژگی ۹۵ درصد، همخوانی بالایی با روش مولکولی ارائه داد و از کیت‌های تشخیص سریع ایمونوکروماتوگرافی نیز قابلیت اعتماد بیشتری نشان داد (۳۰، ۳۱).

مطالعه حاضر علی‌رغم نتایج ارزشمند، دارای محدودیت‌هایی است که باید در تفسیر یافته‌ها مدنظر قرار گیرند. نخست آنکه حجم نمونه مورد استفاده نسبتاً محدود بود و تعمیم نتایج به جمعیت‌های وسیع‌تر نیازمند بررسی‌های آتی با تعداد بیشتری از نمونه‌ها است. دوم، تمام تحت‌تیپ‌های پاروویروس سگ‌سانان به‌طور کامل ارزیابی نشدند و کارایی آزمون در برابر سویه‌های متنوع ویروس نیازمند مطالعات تکمیلی است.

از نقاط ضعف در روش کار مطالعه حاضر این است که SAT و SIT به‌عنوان روش‌های قدیمی مبتنی بر آگلوتیناسیون، به‌طور بنیادین دارای محدودیت‌های ماهوی می‌باشند. این روش‌ها از نظر حساسیت و دقت قابل مقایسه با PCR یا کشت سلولی نمی‌باشند،

تکرارپذیری آن‌ها پایین است، به کیفیت نمونه و شرایط محیطی بسیار وابسته می‌باشند و احتمال بروز خطا، به‌ویژه در موارد با بار ویروسی کم، قابل توجه است. همچنین آماده‌سازی اریتروسیت‌ها و انجام مراحل آزمون نیازمند دقت بالاست و در مقایسه با کیت‌های تجاری، ممکن است فرایندی وقت‌گیر و در برخی موارد خسته‌کننده تلقی شود. باتوجه به اینکه تشخیص CPV در شرایط ایده‌آل با استفاده از روش‌های استاندارد دشوار نیست، اتکای صرف بر تکنیک‌های آگلوتیناسیونی نمی‌تواند نیاز تشخیصی کامل را برآورده کند. بااین حال انگیزه اصلی استفاده از این روش‌ها در مطالعه حاضر، جایگزینی روش‌های مرجع نیست، بلکه ارزیابی ارزش عملی آن‌ها در محیط‌های کم‌امکانات است؛ شرایطی که در آن‌ها دسترسی به PCR، کشت سلولی یا آزمایشگاه تخصصی ممکن نیست و ناچار باید از ابزارهای ساده‌تر استفاده شود؛ بنابراین ضعف‌های روش موجود بخشی از ماهیت کار است، اما همین ضعف‌ها ضرورت مطالعه حاضر را نیز توجیه می‌کند.

برای نخستین بار در ایران، مطالعه حاضر کارایی روش آگلوتیناسیون روی لام را با بهره‌گیری از اریتروسیت گربه به‌طور جامع، به‌منظور تشخیص پاروویروس سگ‌سانان مورد ارزیابی قرار داد که پیشرفتی مهم در دامپزشکی محسوب می‌شود. از آنجایی که روش استاندارد انجام این آزمون با استفاده از خون خوک یا میمون، به دلیل محدودیت‌های دسترسی و ملاحظات مذهبی، اجرای آن را در برخی کشورها با دشواری مواجه کرده است، نوآوری مهم مطالعه حاضر در به‌کارگیری اریتروسیت گربه بود که این مشکل را برطرف می‌کند؛ یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد اریتروسیت گربه می‌تواند جایگزینی مناسب با حساسیت و ویژگی مشابه با اریتروسیت‌های مرجع باشد و این امر محدودیت‌های عملی روش‌های قبلی را مرتفع می‌کند. به‌طور کلی مطالعه حاضر می‌تواند تحولی در روند تشخیصی بیماری‌های ویروسی ایجاد کند. به همین دلیل پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های آینده، امکان استفاده از این تکنیک بهینه‌سازی‌شده در سایر بیماری‌های ویروسی دامپزشکی نیز بررسی شود تا دامنه کاربرد آن گسترش یابد.

نتیجه‌گیری نهایی: باتوجه به نتایج مطالعه حاضر، روش آگلوتیناسیون روی لام با بهره‌گیری از اریتروسیت گربه، تحولی کارآمد در تشخیص سریع و مقرون‌به‌صرفه عفونت پاروویروسی سگ‌سانان به شمار می‌آید. بدیهی است که روش‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر مانند SAT و SIT در مقایسه با PCR و کشت سلولی از نظر حساسیت، دقت و قدرت تمایز محدودیت ساختاری دارند. این محدودیت‌ها به معنای ضعف روش نیست، بلکه ماهیت ذاتی تکنیک‌های آگلوتیناسیونی است که اساساً برای تشخیص قطعی طراحی نشده‌اند. هدف از به‌کارگیری این روش‌ها در مطالعه حاضر، جایگزینی روش‌های استاندارد و مرجع نبود، بلکه ارزیابی توان آن‌ها به‌عنوان ابزارهای کمکی در شرایطی است که دسترسی به امکانات مولکولی یا کشت وجود ندارد. همچنین اصلی‌ترین نوآوری مطالعه حاضر معرفی اریتروسیت گربه به‌عنوان جایگزینی عملی برای اریتروسیت خوک یا میمون در روش آگلوتیناسیون روی لام است. این دستاورد ضمن رفع محدودیت‌های اجرایی در کشورهای اسلامی، امکانی فراهم می‌کند تا این آزمون به‌عنوان روشی سریع و مقرون‌به‌صرفه در تشخیص عفونت پاروویروس سگ‌سانان، در مراکز با امکانات محدود، مورد استفاده قرار گیرد. این دستاورد نه تنها گامی مؤثر در مسیر کنترل شیوع این بیماری و بهبود مدیریت سلامت سگ‌سانان محسوب می‌شود، بلکه زمینه‌ساز پیشرفت روش‌های تشخیصی بیماری‌های ویروسی و مطالعات آتی است.

سپاسگزاری

از تمام همکاران ارجمند دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و اساتید محترمی که با ارائه نقطه‌نظرات ارزشمند خود در پیشبرد این مطالعه یاری رسانیدند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافعی در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Dall'Ara P, Lauzi S, Filipe J, Caseri R, Beccaglia M, Desario C, et al. Discrepancy between in-clinic and haemagglutination-inhibition tests in detecting maternally-derived antibodies against canine parvovirus in puppies. Front Vet Sci. 2021;8:630809. doi: 10.3389/fvets.2021.630809 PMID: 33732742

2. Hemmatzadeh F, Jamshidi S. First report of isolation of canine parvovirus in Iran (In Persian). *J Vet Res.* 2002;57(2):33-35.
3. Faraji R, Mostafavi B, Sadeghi M, Decaro N, Vasinioti V, Desario C, et al. Genomic characterization and phylogenetic evolution of the canine parvoviruses in Iranian dogs, a nationwide study: CPV evolutionary analysis in Iran. *Acta Trop.* 2023;244:106948. [doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106948](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106948) [PMID: 37224989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37224989/)
4. Morovvai A, Keyvanfar H, Zargar M. Molecular phylogenetic analysis of canine parvovirus strains circulating in iran. *Iran J Virol.* 2021;15(2):40-45.
5. Neyestani N, Madani K, Shirani D, Mehrzad J. Involvement of canine parvovirus in mRNA expression levels of key lectins and caspases in blood leukocytes. *Vet Res Commun.* 2024;49(1):12. [doi: 10.1007/s11259-024-10586-8](https://doi.org/10.1007/s11259-024-10586-8) [PMID: 39560803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39560803/)
6. Asil MS, Zarifian N, Valafar A, Shirani D, Mehrzad J. Noticeable immune dysregulation-and-suppression in parvovirus affected dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2023;265:110663. [doi: 10.1016/j.vetimm.2023.110663](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110663) [PMID: 37939594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37939594/)
7. Mia M, Hasan M. Update on canine parvovirus infection: a review from the literature. *Vet Sci Res Rev.* 2021;7(2):92-100. [doi: 10.17582/journal.vsrr.2021.7.2.92.100](https://doi.org/10.17582/journal.vsrr.2021.7.2.92.100)
8. Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, et al. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods.* 2005;126(1-2):179-85. [doi: 10.1016/j.jviromet.2005.02.006](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.006) [PMID: 15847935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15847935/)
9. Mohyedini S, Jamshidi S, Rafati S, Nikbakht GR, Malmasi A, Taslimi Y, et al. Comparison of immunochromatographic rapid test with molecular method in diagnosis of canine parvovirus. *Iran J Vet Med.* 2013;7(1):57-61. [doi: 10.22059/ijvm.2013.32024](https://doi.org/10.22059/ijvm.2013.32024)
10. Marulappa SY, Kapil S. Simple tests for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus-specific antibodies. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(1):127-31. [doi: 10.1128/CVI.00304-08](https://doi.org/10.1128/CVI.00304-08) [PMID: 18987166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18987166/)
11. Carmichael L, Joubert J, Pollock R. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res.* 1980;41(5):784-91. [PMID: 6250432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6250432/)
12. Pereira CA, Monezi TA, Mehnert DU, D'Angelo M, Durigon EL. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol.* 2000;75(2):127-33. [doi: 10.1016/s0378-1135\(00\)00214-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00214-5) [PMID: 10889403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10889403/)
13. Senda M, Parrish CR, Harasawa R, Gamoh K, Muramatsu M, Hirayama N, et al. Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J Clin Microbiol.* 1995;33(1):110-3. [doi: 10.1128/jcm.33.1.110-113.1995](https://doi.org/10.1128/jcm.33.1.110-113.1995) [PMID: 7699026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7699026/)
14. Tuteja D, Banu K, Mondal B. Canine parvovirology–A brief updated review on structural biology, occurrence, pathogenesis, clinical diagnosis, treatment and prevention. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2022;82:101765. [doi: 10.1016/j.cimid.2022.101765](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101765) [PMID: 35182832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35182832/)
15. Rabbani AH, Ullah Q, Naseer O, Raza AI, Shahid M, Ali S, et al. canine parvo virus: a review on current perspectives in seroprevalence, diagnostics and therapeutics. *Glob Vet.* 2021;23(2):113-26. [doi: 10.5829/idosi.gv.2021.113.126](https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2021.113.126)
16. Parrish CR, Sykes JE. Canine parvovirus infections and other viral enteritides. In: Greene CE, editor. ^{5th} ed. *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Elsevier. St. Louis, USA. 2021.p. 341-351.
17. Walter-Weingärtner J, Bergmann M, Weber K, Truyen U, Muresan C, Hartmann K. Comparison of eight commercially available faecal point-of-care tests for detection of canine parvovirus antigen. *Viruses.* 2021;13(10):2080. [doi: 10.3390/v13102080](https://doi.org/10.3390/v13102080) [PMID: 34696513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34696513/)

18. Decaro N, Cirone F, Desario C, Elia G, Lorusso E, Colaianni M, et al. Severe parvovirus in a repeatedly vaccinated 12-year-old dog. *Vet Rec.* 2008;164(19):593–595. [doi: 10.1136/vr.164.19.593](https://doi.org/10.1136/vr.164.19.593) [PMID: 19429938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19429938/)
19. Kumari GD, Pushpa R, Subramanyam K, Rao TS, Satheesh K. A comparative assessment of haemagglutination assay and polymerase chain reaction in detecting canine parvovirus from fecal samples. *Explor Anim Med Res.* 2020;10(2):204-209.
20. Dik I, Şimşek A. Comparison of different diagnostic methods in detection of canine parvovirus infection. *Eurasian J Vet Sci.* 2021;37(2). [doi: 10.15312/EurasianJVetSci.2021.329](https://doi.org/10.15312/EurasianJVetSci.2021.329)
21. Chang SF, Sgro JY, Parrish CR. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol.* 1992;66(12):6858-6867. [doi: 10.1128/JVI.66.12.6858-6867.1992](https://doi.org/10.1128/JVI.66.12.6858-6867.1992) [PMID: 1331498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1331498/)
22. Cavalli A, Martella V, Desario C, Camero M, Lanave G, Barrs V, et al. Modified haemagglutination inhibition assay for the detection of canine parvovirus type 2 antibodies in dog sera. *Vet J.* 2021;274:105709. [doi: 10.1016/j.tvjl.2021.105709](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105709) [PMID: 34157378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34157378/)
23. Senda M, Hirayama N, Yamamoto H, Kurata K. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Vet Microbiol.* 1986;12(1):1-6. [doi: 10.1016/0378-1135\(86\)90035-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90035-0) [PMID: 3727364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3727364/)
24. Senda M, Hirayama N, Itoh O, Yamamoto H. Canine parvovirus: strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. *J Gen Virol.* 1988;69(2):349-354. [doi: 10.1099/0022-1317-69-2-349](https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-2-349) [PMID: 3339330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3339330/)
25. Uma M, Nivetha K, Pradeepika N, Mohanakrishnan H. Validation of haemagglutination, haemagglutination inhibition and antibody neutralization assays used to determine the titre of CPV-2 virus and anti CVP-2 egg yolk antibodies. *Int J Health Sci.* 2022;6(S8):2820-2831. [doi: 10.53730/ijhs.v6nS8.12686](https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS8.12686)
26. Al-Bayati H, Odishosh M, Majeed H. Detection of canine parvovirus in Iraq by using rapid antigen test kit and haemagglutination–inhibition test. *Al-Anbar J Vet Sci.* 2010;3:17-23.
27. Veijalainen P, Neuvonen E, Niskanen A, Juokslahti T. Latex agglutination test for detecting feline panleukopenia virus, canine parvovirus, and parvoviruses of fur animals. *J Clin Microbiol.* 1986;23(3):556-9. [doi: 10.1128/jcm.23.3.556-559.1986](https://doi.org/10.1128/jcm.23.3.556-559.1986) [PMID: 3007568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3007568/)
28. Mochizuki M, San Gabriel M, Nakatani H, Yoshida M, Harasawa R. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci.* 1993;55(1):60-3. [doi: 10.1016/0034-5288\(93\)90035-e](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90035-e) [PMID: 8397433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8397433/)
29. aini A, Mahajan V, Kaur G, Sandhu BS. Comparison of diagnostic tests for detection of canine parvo viral enteritis. *Indian J Vet Pathol.* 2024;48(3):226–230. [doi: 10.5958/0973-970X.2024.00037.8](https://doi.org/10.5958/0973-970X.2024.00037.8)
30. Namroudi S, Rostami A, Barin A, Ardebili K. Antibody monitoring to canine distemper virus in unvaccinated rural dogs in the southern coastal region of the Caspian Sea (In Persian). *J Vet Res.* 2013;68(3):215-221. [doi: 10.22059/jvr.2013.35034](https://doi.org/10.22059/jvr.2013.35034)
31. Alizadeh S, Jamshidi S, Abdollahpour G, Moosavian H, Akbarein H, Yousefsani ZS. Prevalence of leptospirosis in cats with renal failure: serologic study and urinary molecular evaluation (In Persian). *J Vet Res.* 2023;78(2):145-152. [doi: 10.22059/jvr.2023.362636.3367](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.362636.3367)