

# اولین گزارش جداسازی پاروویروس سگ در ایران

دکتر فرهید همت زاده<sup>۱</sup> دکتر شهرام جمشیدی<sup>۲</sup>

## First report of isolation of canine parvovirus in Iran

Hemmatzadeh, F.,<sup>1</sup> Jamshidi, S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. <sup>2</sup>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 referred to Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, with clinical signs of vomiting, diarrhea and anorexia. In clinical examinations, severe dehydration, melena and in cell blood count, leukopenia were evident. Immunoblotting 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 culture supernatant, after preparation was studied by E.M and parvoviral particles was detected.

**Conclusion:** This is the first report of dog parvovirus isolation in

Iran. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.* 57, 2: 33-35, 2002.

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

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

طرح: مطالعه موردی.

تاریخچه: سگ نر ۷ ماهه ای از نژاد مخلوط با علائم استفراغ، اسهال و بی اشتها 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 ( $500/\mu l$ ) 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 ۳-۴ روز ایجاد شده و از نمونه های حاصله در کیت تشخیصی پاروویروس سگ مجدداً پاسخ مثبت دریافت گردید. مشاهده همین نمونه پس از اولترا سانتریفوژ و آماده سازی در زیر میکروسکوپ الکترونی حضور ذرات پاروویروسی را نشان داد که دال بر جداسازی پاروویروس سگ از نمونه های مرضی مربوط به سگ مبتلا است.

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

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

ویروس عامل بیماری پاروویروس سگ متعلق به دون خانواده پاروویرینه، جنس پاروویروس از خانواده پاروویریده است. این ویروس واجد ژنوم DNA تک رشته ای، تک ملکولی با سنس معمولاً منفی واجد تقارن بیست وجهی و فاقد غشاً به اندازه ۲۵ نانومتر می باشد. اعضا جنس پاروویروس همانند اریترویروس ها و برخلاف دیندوویروس 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 پاروویروس 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 بر جای می گذارند. از این اصل برای جداسازی و کشت پاروویروسها نیز استفاده می گردد (۳، ۵، ۷).

تاکنون دو نوع پاروویروس سگ مورد شناسایی قرار گرفته که به اسامی تیپ ۱ و تیپ ۲ پاروویروس سگ (CPV-1 & CPV-2) نامگذاری گردیده اند، تیپ ۱ را ویروس مینوت سگ نیز می گویند، بین تیپ ۲ و پاروویروس های گربه و سنجاب شباهتهای فراوانی وجود دارد. پاروویروس سگ توان تکثیر در سلولهای با منشأ سگ و گربه را داراست در حالی که پاروویروس گربه تنها در سلولهای با منشأ گربه قادر به تکثیر می باشد. عفونتهای پاروویروسی سگ در اکثر موارد ناشی از پاروویروس 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، الیزا، خنثی سازی سرم، واکنش زنجیری پلیمرز، و آزمونهای HA و HI می باشند. جالب توجه آنکه در شرایط اوج

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

بیماری هر گرم مدفوع حاوی  $10^9$  ذره ویروس معادل ۲۰۰۰۰ واحد هماگلوتیناسیون می باشد (۲، ۷، ۸).

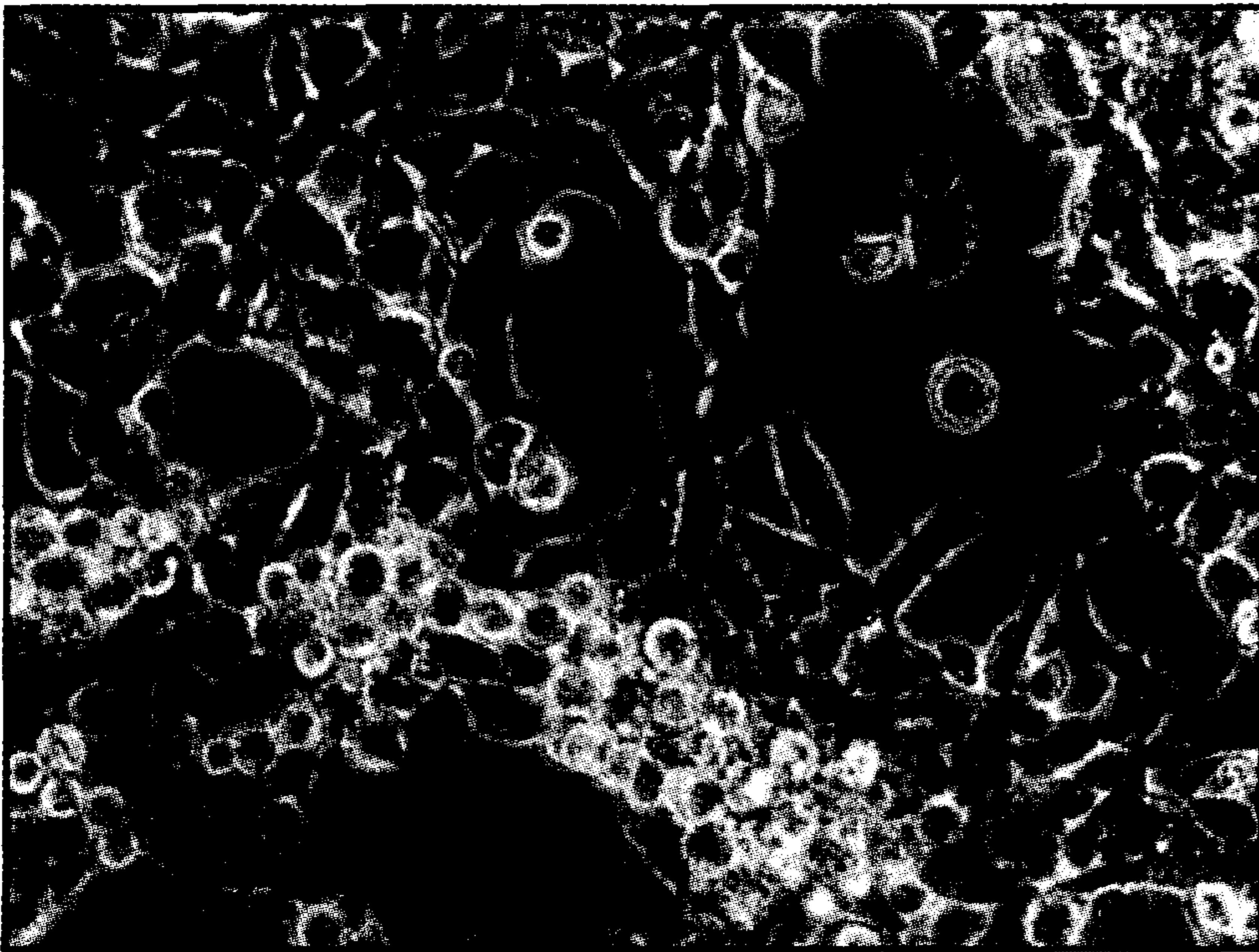
درمان بیماری به شکل درمان علامتی توسط جایگزینی مایعات و الکترولیتها و به کارگیری آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف مثل پنی سیلین و جنتامایسین و کنترل استفراغ توسط متوکلوپراماید انجام می گیرد (۳).

**مشاهدات بالینی:** سگ نر ۷ ماهه ای از نژاد مخلوط با علائم استفراغ، اسهال و بی اشتها 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 تأیید می نمود به شکلی که مدفوع کاملاً حالت قیری و سیاه رنگ 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 ( $WBC = 500/\mu l$ ) بویژه تعداد نوتروفیلها ( $Neut = 50/\mu l$ ) بود. همزمان یک نمونه سرمی هم به منظور انجام





تصویر ۲- ایجاد CPE در کشت سلولی MDCK ناشی از تکثیر پاروویروس.

پرداخته شد. با توجه به خالص سازی و تغلیظ نمونه مذکور اجرام پاروویروسی 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 پاروویروس در این مورد را به تأیید قطعی رهنمون می سازند (۱،۴،۶).

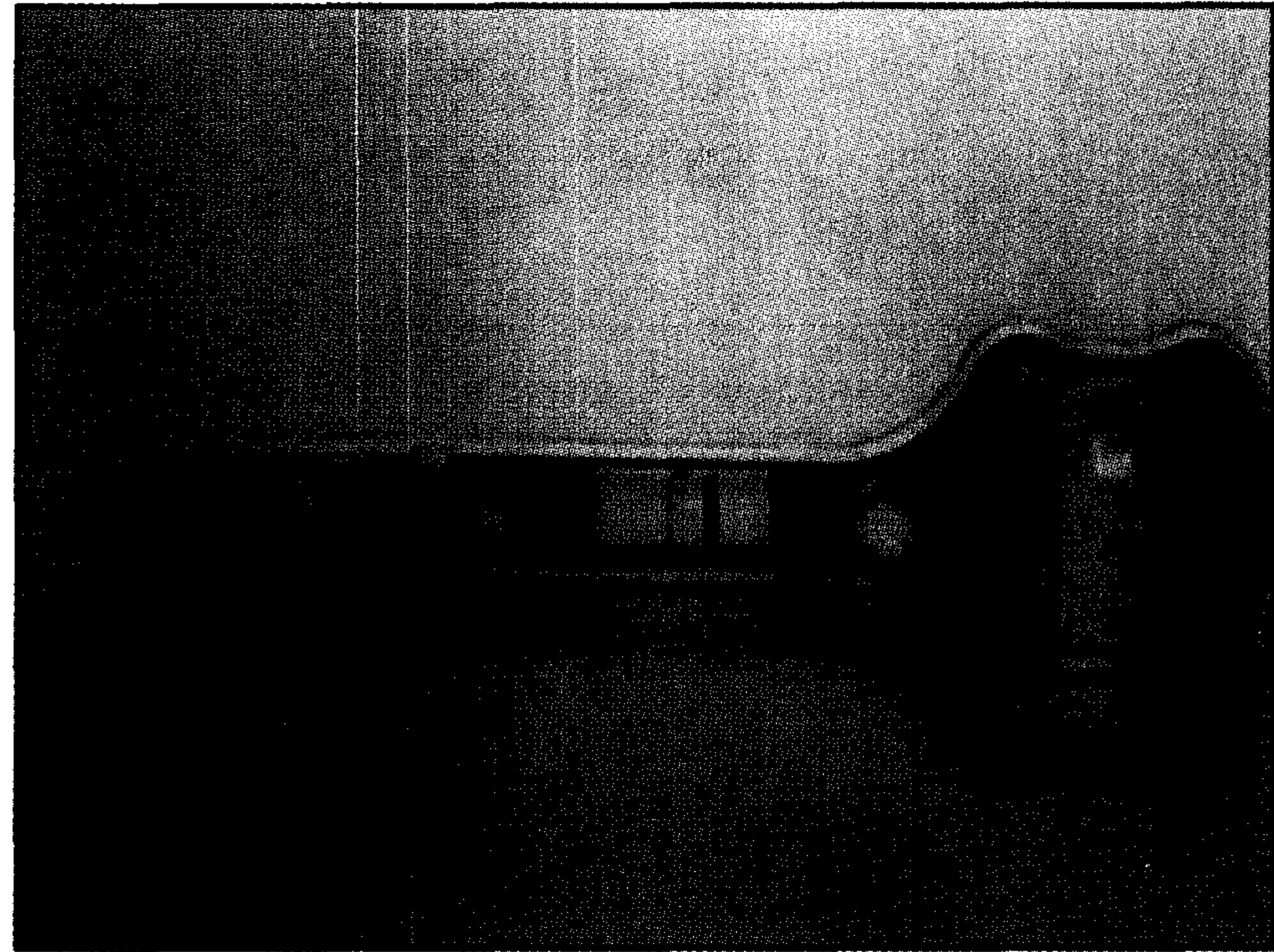
همزمان با برنامه جداسازی و تشخیص ویروس در مان حیوان نیز با توسل به الکترولیت تراپی و تجویز پنی سیلین، جنتامایسین و متوکلوپراماید طی یک برنامه منظم انجام گرفت و روند بهبودی حیوان مذکور پس از ۳ روز آغاز گردید. رفع علائم اسهال و افزایش تعداد سلولهای سفید خون به ۱۲۰۰ در میکرو لیتر و بویژه افزایش نوتروفیل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

#### بحث

پاروویروس 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 کریبت 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 پاروویروس 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 پاروویروس 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 پاروویروس های سگ از نظر رشد و تکثیر تیره سلولی MDCK وجود داشته باشد. جهت تعیین تیپ پاروویروس های سگ معمولاً از آزمونهای بیولوژی ملکولی مثل



تصویر ۱- تشکیل دو باند مجزا به نشانه پاسخ مثبت در آزمون ردیابی پادگن.

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

مقداری نمونه مدفوع توسط اسپاتول پلاستیکی ویژه نمونه برداری از رکتوم حیوان اخذ شده و بدو، توسط کیت تشخیص پادگنی پاروویروس 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 غشای نیتروسلولوزی کیت بود (تصویر ۱)، 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.

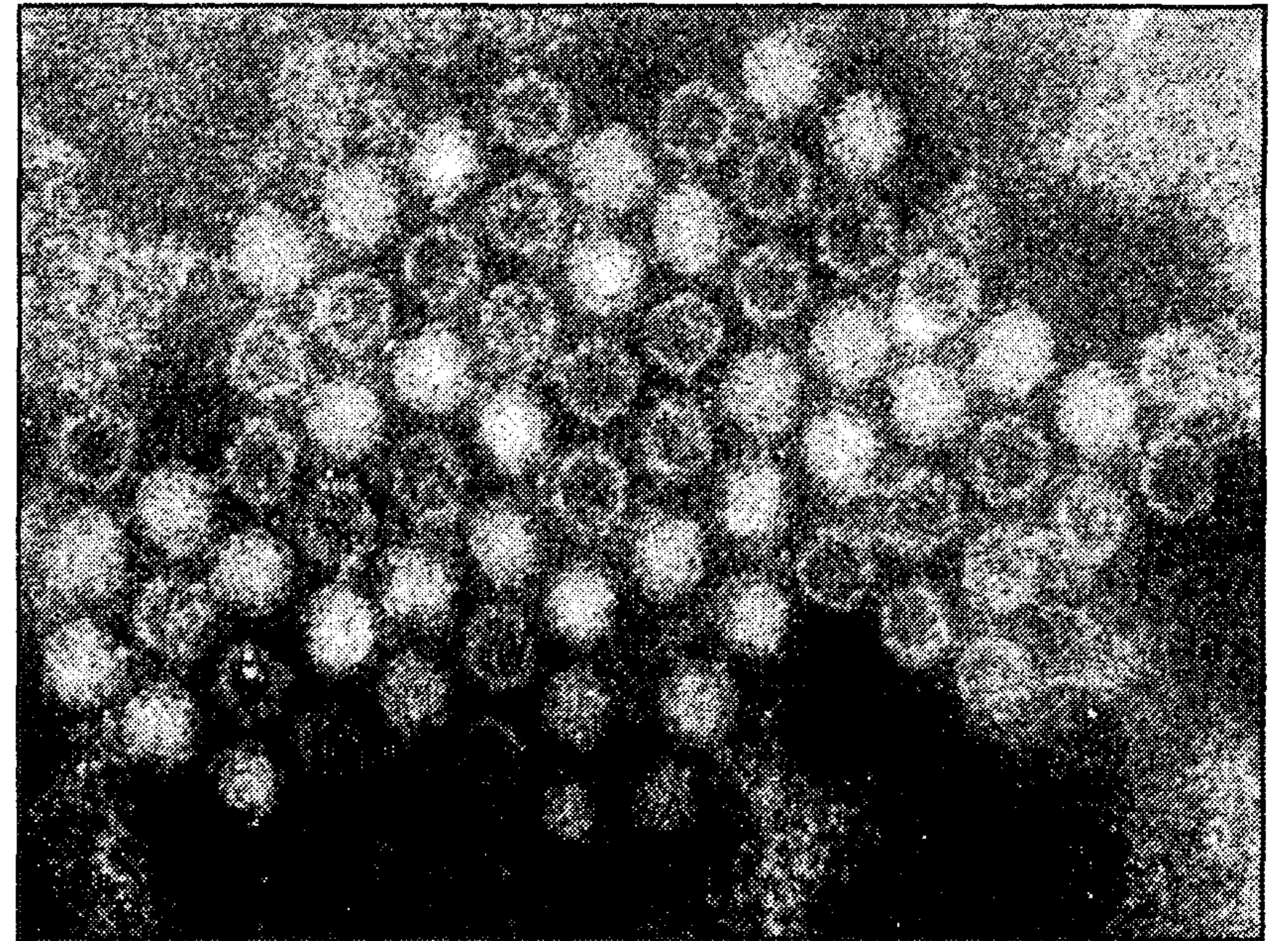
کشت سلولی مورد استفاده تیره سلولی MDCK تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به کد NCBI C426 بود که پس از تریپسینه کردن و تهیه تعلیق سلولی مناسب میزان ۰/۵ میلی لیتر از نمونه مشکوک به پلیتهای ۲۴ سانتیمتری Nunc حاوی ۱۰ میلی لیتر تعلیق سلولی MDCK در محیط کشت سلولی RPMI حاوی ۱۰ درصد FCS اضافه شده و 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 مذکور CPE 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 پاروویروس آزمایش شد که در این مراحل نیز حضور ویروس در کشتهای سلولی به تأیید رسید. نمونه سرمی تهیه شده در روز اول فاقد پادتن های ضد پاروویروسی در آزمون SN بود که این نکته بر عدم ایمنی قبلی حیوان صحه گذاشت.

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



## 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, immunoelectrosmophoresis 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*, 5<sup>th</sup> ed. WB Saunders Co., PP: 420-422.
4. Hudson, L. and Hay, F.C. (1989): *Practical Immunology* 3<sup>rd</sup> 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 panleukopenia 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.* 3<sup>rd</sup> ed. Academic Pres Ink. PP: 335-342.
8. Nelson, RW. (1994): *Small Animal Internal Medicine*, 2<sup>rd</sup> 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.



تصویر ۳ - تصویر میکروسکوپ الکترونی از پاروویروس 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 زیاد تر 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 پاروویروس 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 PCR نیز استفاده نمود (۶،۹،۱۰).

