مطالعه وضعیت آلودگی با ویروس هاری کاذب در گرازهای وحشی ایران (اولین گزارش)

دکتر فرهید همت زاده[1]* دکتر آرزو علی نژاد[1] دکتر مجید خرازیان مقدم[2]

دریافت مقاله: ۱۱ خردادماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۴ آذرماه ۱۳۸۳

هدف: بررسی سرولوژیک وضعیت آلودگی با ویروس هاری کاذب در گرازهای وحشی .

طرح: مطالعه توصیفی.

حیوانات: ۲۸ رأس گراز وحشی شکار شده از استانهای مختلف کشور .

روش: پس از شناسایی و شکار گرازها، سریعا اقدام به خونگیری از آنها شده پس از جدا سازی سرم، کلیه نمونه‌ها با استفاده از کیت تشخیص سرمی اوژسکی به روش الایزای انسدادی (Blocking ELISA) آزمایش شده و نتایج در دستگاه قرائت کننده الایزا قرائت گردید.

نتیجه گیری: از میان ۲۸ نمونه آزمایش شده، ۱۲ مورد مثبت (۴۲/۸ درصد) مربوط به استانهای تهران مرکزی، خراسان، زنجان، گلستان، فارس و اصفهان مشاهده گردید. آلودگی در جنس نر ۴۰ درصد و در ماده‌ها ۵۰ درصد و متوسط سن موارد مثبت ۵/۱ و موارد منفی ۴/۹ سال برآورد می‌گردد . مشاهده این موارد دال برگستردگی چشمگیر آلودگی در بین خوکهای وحشی مملکت می‌باشد که توجه فراوانی را در رابطه با انتقال بیماری به انسان وسایر حیوانات وهمچنین پاره‌ای از مصرف کنندگان داخلی گوشت گراز، می طلبد .

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۹۰ - ۲۸۷.

واژه‌های کلیدی: ویروس هاری کاذب، بیماری اوژسکی، گراز، الایزا.

Study of Infection caused by pseudorabies virus (PHV-1) in Iranian wild boars (First report)

Hemmatzadeh, F.,[1] Alinejad, A.,[1] Kharazian Moghadam, M.[2]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran. [2]Iranian Organization of Environment, Tehran-Iran.

Objectives: Serological study of infection caused by pseudorabies virus (PHV-1) in Iranian wild boars.
Designe: Descriptive study.
Animals: 28 wild boars were captured in different provinces of Iran.
Procedurs: After bleeding of hunted boars, serum samples were collected and tested by using a blocking ELISA kit (Eurodiagnostica). Results were detected by an ELISA reader machin.
Results: 12 out of 28 sera samples (42.8%) from the boars of Tehran, Markazi, Khorasan, Zanjan, Golestan, Fars and Esfahan provinces were positive. Total infection rate (42.8%) was diagnosed as 40% of male versus 50% of female boars. Average age in positive and negative cases was 5.1 and 4.9 years, respectively. This results show the considerable spread of the infection among Iranian wild boars (42.8%) which is indicating a need of great attentions to the risk of transmission of the disease to animals, human and specially boar meat consumers. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,3:287-290,2005.***
Keywords: pseudorabis virus, wild boar, ELISA, Iran.
Corresponding author's email:fhemmat@ut.ac.ir

ویروسی بودن بیماری هاری کاذب برای اولین بار در سال ۱۹۰۲ میلادی توسط Aujeszky در مجارستان گزارش شد و بعداً مشخص گردید که در بسیاری از کشورهای جهان این بیماری وجود دارد. بیماری اغلب توسط خوکهای آلوده به سایر میزبانان منتقل می‌گردد گرچه خوکها و سایر گوشت خواران می توانند آلودگی را از لاشه موشهای رت و راکونهای آلوده نیز دریافت نمایند. در بسیاری از کشورها آلودگی گاوها هنگامی رخ می‌دهد که مجاورتی با خوکها وجود داشته باشد ولی از طریق تلقیح ویروس بسیاری از حیوانات خونگرم و حتی پرندگان امکان آلودگی تجربی را داشته‌اند، خرگوش حساس ترین حیوان به این بیماری است. بیماری به شکل طبیعی در خوک، گاو، گوسفند، بز، سگ، گربه، طیور، مینک رت، راکون و انسان اتفاق می‌افتد، بیماری در خوکهای جوان به شدت کشنده است(۹).

بیماری در گاو اصطلاحاً خارش دیوانه‌وار (Mad Itch) نامیده می‌شود. متعاقب عفونت احساس خارش شدید که منجر به زخم شدگی ناحیه کفل و رانها می‌شود دیده شده است در اثر پیشرفت بیماری و درگیر شدن مدولا حالت فلجی حلق، ریزش بزاق سختی تنفس و اختلالات قلبی مشاهده می‌گردد ولی حیوان هوشیاری خود را دارد. مرگ، ظرف ۴۸ ساعت رخ می‌دهد.(۸،۹)

موارد بیماری در سگ و گربه در برخی از کشورهای اروپایی مشاهده شده است. در برخی موارد مرگ و میر سگ‌ها و گربه‌ها قبل از بروز علایم مشخصه بیماری اتفاق می‌افتد. علایم مشخصه بیماری خارش شدید است که به دنبال آن تمایل به گاز گرفتگی قسمتهای حساس در خود حیوان رخ میدهد، فلجی فک و حلق به دنبال پیشرفت بیماری حادث شده و به ریزش بزاق از دهان منجر می‌گردد که این چهره از بیماری بسیار شبه هاری در سگ می‌باشد با این تفاوت، که تمایل به حمله و گاز گرفتن در این بیماری وجود ندارد و تب هم مشاهده نمی‌شود. در برخی از سگ‌ها مرگ و میر به علت آسیبهای قلبی رخ می‌دهد(۴،۷).

ویروس عامل بیماری هاری کاذب (pseudorabies virus ,PRV) یا اوژسکی (Aujeszkys disease virus ADV) متعلق به خانواده هرپس ویریده و دون خانواده آلفا هرپس ویرینه است، این ویروس به نام هرپس ویروس تیپ یک

۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) سازمان حفاظت محیط زیست ایران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: *fhemmat@ut.ac.ir*

خوکی (Purcine herpesvirus 1,PHV-1) نیز نامیده می‌شود. ویروس عامل بیماری نسبتا مقاوم است و در تامپون گلیسرین دار به مدت ۵ ماه و در یخچال باقی می‌ماند، ۳۰ روز در یونجه خشک دوام آورده ولی ضد عفونی کننده‌های معمول آن را سریعاً نابود می‌کنند(۹).

گلیکوپروتین ۹۸ کیلودالتونی gIII به عنوان لیگاند ویروسی عمل کرده و در اثر آنتی بادیها خنثی می‌گردد، مطالعات انجام گرفته حاکی از عدم وجود اختلافات مشهود در آنتی ژنهای ویروس در نقاط مختلف دنیا می‌باشد ولی برخی تغییرات آنتی ژنی در حد ردیف در برخی سویه‌ها دیده شده است. از نظر هومولوژی ژنومی بیشترین شباهت را با ویروس‌های واریسلا زوستر و هرپس سیمپلکس دارد. علاوه بر آن پروتئین‌های واجد واکنش متقاطع بین این ویروس و هرپس ویروس تیپ یک گاوی وجود دارد(۷،۳).

ویروس را می‌توان در کشت سلول بیضه خرگوش، پرده کوریوالانتوئیک تخم مرغ جنین دار کشت سلول کلیه میمون و کشت سلول فیبروبلاست جنین جوجه، خرگوش، خوکچه هندی و سگ کشت داد(۹،۶).

عفونت در میزبانهای اصلی بدون علامت است مصرف بقایای بافتی خوکها یا گاوهای آلوده مهمترین منبع آلودگی سگ و گربه است. ویروس در ادرار و بزاق خوکها وجود دارد ولی آلوده کننده نبوده تنها ترشحات بینی می‌توانند آلوده کننده باشند. رتهای قهوه‌ای به آسانی آلوده شده و علایم را نشان میدهند و سگها می‌توانند از راه شکار رتهای بیمار آلوده شوند. یروس از گراز به خوک و بالعکس قابل انتقال است. امبریوخوک و گاو قابلیت آلودگی با ویروس اوژسکی را نداشته ولی خود جنین خوک آلوده شده و به سقط منجر می‌شود. بقایای سقطی خوکها از مهمترین منابع آلوده کننده سایر حیوانات و بویژه رت‌ها و گوشتخواران می‌باشند. ایمنی هومورال متعاقب عفونت تا مدتها دوام آورده و حیوان ایمن باقی می‌ماند ولی همانند سایر آلفا هرپس ویروس‌ها ویروس هاری کاذب می‌تواند به شکل پنهان در بدن خوکسانان باقی بماند. اولین پادتن‌ها ۳ روز پس از عفونت ظاهر شده و در روز ۱۴ به حد اکثر می‌رسند و واکنش‌های سلولی از روز چهارم قابل تشخیص می‌باشند. برای تشخیص از جداسازی در بدن خرگوش یا کشت سلول یا تشخیص‌های سرولوژیک یا آزمون جلدی می‌توان بهره گرفت(۹،۵،۱).

آزمون‌های سرولوژیک مثل خنثی سازی سرم، ایمونودیفوزیون، رادیو ایمونواسی، الایزا و دات الایزا و ایمونوفلورسنت برای تشخیص یا ردیابی پادتن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برای واکسیناسیون خوکها امروزه از واکسن‌های فاقد گلیکوپروتئین gE استفاده کرده و روشهای تشخیص سرولوژیک عفونت را بر اساس تشخیص پادتن‌های ضد gE تنظیم نموده‌اند(۴،۲).

مواد و روش کار

نمونه‌های سرمی گرازهای شکار شده از سراسر مملکت، کیت الایزا و دستگاه قرائت کننده الایزا و سمپلر در اندازه‌های مختلف.

نمونه‌گیری: نمونه‌های تهیه شده در این بررسی مربوط به طرح تحقیقاتی مطالعه بیماریهای عفونی حیات وحش ایران بوده که با همکاری سازمان حفاظت محیط زیست از استانهای تهران، یزد، سمنان، مرکزی، خراسان، کرمان، زنجان، گلستان، فارس و اصفهان تهیه شده‌اند. نمونه‌های مورد آزمایش شامل ۲۸ نمونه سرمی مربوط به گرازهای دارای سنین مختلف می‌باشند. جدول ۱ مشخصات و محل شکار گرازهای مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

آزمون الایزا: آزمون الایزا با استفاده از کیت تجارتی تشخیص سرمی بیماری اوژسکی ساخت شرکت یورودیاگنوستیکای سوئد (Eurodiagnostica) انجام گرفت. این آزمون بر اساس الایزای انسدادی یا ایمونوکاپچر الایزای رقابتی بوده که پادتن‌های تشکیل شده بر علیه گلیکوپروتین I (gI) سطحی ویروس را تشخیص میدهد. در این سیستم از دو پادتن منوکلونال شماره یک و شماره ۲ ضد gI که شاخصه‌های پادگنی مختلفی را در gI شناسایی می‌کنند استفاده می‌گردد. پادتن منوکلونال شماره ۲ توسط پراکسیداز (HRPO) کنژوگه شده است و گوده‌های پلیت توسط پادتن منوکلونال غیر کنژوگه ضد پادگن gI ویروس پوشیده شده‌اند این پادگن جزو گلیکوپروتین‌های سطحی ویروس بوده و جزو اولین پادگنهایی است که به شکل گیری پاسخ ایمنی هومورال منجر می‌شود. علاوه بر دو پادتن فوق، پادگن استاندارد و نمونه سرم کنترل مثبت و کنترل منفی، تامپون شستشو، محلول متوقف کننده حاوی اسید سولفوریک و محلول سوبسترای تترامتیل بنزیدین جزو مواد تشکیل دهنده کیت می‌باشند(۲).

جهت انجام آزمون مخلوط سرم حیوان، پادگن استاندارد و پادتن منوکلونال شماره ۲ ضد gI به محتویات هر گوده در پلیت که از قبل حاوی پادتن منوکلونال شماره یک (غیر کنژوگه) می‌باشند، اضافه می‌گردد، پس از انکوباسیون ۲ ساعته در ۳۷ درجه، مجموعه پلیت توسط تامپون شستشوی حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ شسته شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای تترامتیل بنزیدین به آن اضافه می‌گردد. پس از نیم ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول توقف حاوی اسید سولفوریک به کل گوده‌ها اضافه شده و دانسیته اپتیک هر گوده در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده الایزا قرائت گردید.

نمونه‌هایی که OD آنها از ۵۰ درصد OD اصلاح شده مربوط به کنترل منفی کمتر باشد به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شده و ثبت می‌گردند.

نتایج

با توجه به تفسیر نتایج آزمون الایزای انجام شده بر روی نمونه‌ها مشخص گردید که از ۲۸ نمونه آزمایش شده ۱۲ نمونه واجد پادتن‌های ضد ویروس اوژسکی بوده و مثبت قلمداد می‌گردند که میزان آلودگی برابر ۴۲/۸ درصد براورد می‌گردد. از بین این ۱۲ نمونه مثبت ۸ نمونه مربوط به گرازهای نر و ۴ نمونه مربوط به گرازهای ماده بوده‌اند که میزان آلودگی نرها معادل ۴۰ درصد و میزان آلودگی ماده‌ها برابر ۵۰ درصد براورد می‌گردد. انجام آزمون آماری دقیق فیشر عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین میزان آلودگی در این دو جنس را نشان می‌دهد.

در بین استانها اساساً در نمونه‌های شکار شده در استانهای کرمان و سمنان آلودگی مشاهده نگردید ولی استانهای آلوده در حد ۲۵ تا ۷۵ درصد را نشان می‌دهند، البته به علت قلت نمونه‌ها این براورد قطعی نبوده و یک تخمین نسبی

جدول۱- مشخصات و محل شکار گرازهای مورد آزمایش.

ردیف	سن (سال)	جنس	استان	محل	نتیجه آزمایش
۱	۵	نر	تهران	پارک ملی کویر	**مثبت**
۲	۴	نر	تهران	پارک ملی کویر	**مثبت**
۳	۴	ماده	تهران	پارک ملی کویر	منفی
۴	۱	نر	تهران	پارک ملی کویر	منفی
۵	۱	نر	سمنان	موجن	منفی
۶	۷	نر	مرکزی	خمین	**مثبت**
۷	۶	ماده	مرکزی	شازند	**مثبت**
۸	۶	نر	مرکزی	شازند	منفی
۹	۶	نر	خراسان	پارک ملی تندوره	**مثبت**
۱۰	۵	نر	خراسان	پارک ملی تندوره	منفی
۱۱	۵	نر	کرمان	پارک ملی خبر	منفی
۱۲	۶	ماده	کرمان	پارک ملی خبر	منفی
۱۳	۴	نر	کرمان	پارک ملی خبر	منفی
۱۴	۴	نر	کرمان	پارک ملی خبر	منفی
۱۵	۸	نر	زنجان	انگوران	منفی
۱۶	۸	نر	زنجان	انگوران	**مثبت**
۱۷	۴	نر	زنجان	انگوران	منفی
۱۸	۴	ماده	زنجان	انگوران	**مثبت**
۱۹	۱	نر	گلستان	پارک ملی گلستان	**مثبت**
۲۰	۵	ماده	گلستان	پارک ملی گلستان	منفی
۲۱	۵	ماده	گلستان	پارک ملی گلستان	**مثبت**
۲۲	۷	نر	گلستان	پارک ملی گلستان	**مثبت**
۲۳	۱۲	نر	فارس	پارک ملی بمو	منفی
۲۴	۳	نر	فارس	پارک ملی بمو	منفی
۲۵	۶	ماده	فارس	پارک ملی بمو	منفی
۲۶	۷	ماده	فارس	پارک ملی بمو	**مثبت**
۲۷	۲	نر	اصفهان	نطنز	**مثبت**
۲۸	۵	نر	اصفهان	نطنز	منفی

محسوب می‌گردد. متوسط سن گرازهای شکار شده ۵/۰۳ سال و متوسط سن گرازهای آلوده ۵/۱۶ و متوسط سن گرازهای منفی ۴/۹۳ سال می‌باشد که اختلاف معنی‌داری بین متوسط سن موارد آلوده و غیر آلوده وجود ندارد.

بحث

عفونت‌های ناشی از ویروس هاری کاذب در سراسر جهان و بویژه در مراکز پرورش و نگهداری خوک همواره مورد توجه بوده‌اند و چهره بالینی بیماری در خوکها، سقط جنین می‌باشد. اما ویژگی استثنایی این ویروس که آن را از سایر آلفا هرپس ویروس‌ها متمایز مینماید، امکان انتقال و ایجاد بیماری در سایر گونه‌های حیوانی و همچنین انسان می‌باشد. با توجه به آنکه در ایران عملا پرورش و نگهداری خوک به لحاظ مسایل شرعی انجام نمی‌شود، لذا اولا زمینه توجه و همچنین اهمیت مطالعه آن زمینه چندانی نداشته و مهم جلوه نمی‌نماید (۸، ۳).

به علت وضعیت خاص اکولوژیک بسیاری از مراتع و جنگل‌های ایران گراز از گستردگی قابل توجهی برخوردار بوده، و حتی در برخی موارد خساراتی را نیز به زمین‌های کشاورزی و مراتع وارد می‌آورد از همین روست که در زمانهای خاصی مراجع ذیربط مجوزهایی را برای شکار این حیوان برای روستاییان یا برخی اقلیت‌های مذهبی صادر می‌نمایند. البته شکار و مصرف غیر قانونی گوشت این حیوان بعضا توسط برخی افراد انجام می‌گیرد.

به علت یکسانی یا مجاورت مراتع و مکانهای چرای گرازها با سایر نشخوارکنندگان اهلی و وحشی امکان انتقال عفونت از گرازهای آلوده به سایر حیوانات وجود داشته و می‌تواند به گسترش بیماری و شکل گیری چهره هاری کاذب در حیوانات غیر میزبان اصلی بیانجامد. طی مطالعه ای که در فرانسه طی یکدوره ۸ ساله به انجام رسیده است میزان آلودگی به طور متوسط ۴/۷ درصد و با نوسان ۱/۲ تا ۶۱ درصد در نقاط مختلف مملکت گزارش گردیده است. در مناطقی آلودگی بالاتر در گرازها دیده شده، در بین خوکها و سایر حیوانات نیز میزان بالاتری از آلودگی گزارش گردیده است. با توجه به این نکته می‌توان انتظار آلودگی در سایر حیوانات اهلی و وحشی که به طریقی در مجاور حیوانات آلوده قرار می‌گیرند را داشت (۳).

با توجه به گستردگی چشمگیر عفونت در بین گرازهای ایران (۴۲/۸ درصد) و همچنین امکان مجاورت و آلودگی سایر حیوانات و همچنین امکان بقای عفونت به شکل مستمر و پنهان در بین گرازها، همواره خطر انتقال بین گونه‌ای می‌بایستی به روشنی برای دست اندرکاران امور بهداشتی و مصرف کنندگان ویژه گوشت گراز شرح داده شود. نکته حایز اهمیت دیگر آنکه در موارد مشکوک به هاری حیوانی و بویژه با توجه به اکوسیستم منطقه مطالعه هاری کاذب نیز مد نظر قرار گیرد.

References

1. Colijn, E.O., Bloemraad, M. and Wensvoort, G., (1997): An improved ELISA for the detection of serum antibodies di-rected against classical swine fever virus. Vet. Microbiol. 59, 15-25.
2. Grom, J., Linde, N. and Ljung, S., (1992): Monoclonal blocking ELISA detecting Aujeszky's disease virus antibodies to the glycoproteins gI and gII. Proceedings Twelfth IPVS Con-gress, The Netherlands, p: 82.
3. Grom, J., Linde, N. and Klingeborn, B. (1995): Aujeszky's disease virus antibodies detected by

gE:gB:gC (gI:gII:gIII) ELISA. In: Schwyzer, M., Ackermann, M., (Eds.), Immunology of viral infections. Proceedings of the Third Congress of the European Society of Veterinary Virology, pp:142-146.

4. Gut, M., Jacobs, C.E., Tyborowska, J., Szewczyk, B. and Bi-enkowska- Szewczyk, K. (1999): A highly specific and sensi-tive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex. Vet. Microbiol. 69, 239-249.
5. Gut-Winiarska, M., Jacobs, L., Kerstens, H., Bienkowska-Szewczyk, K. (2000): A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein B. J. Vir. Meth. 88 (2000): 63-71.
6. Hampl, H., Ben-Porat, L., Ehrlicher, K., Habermehl, O., Kaplan, A.S. (1984): Characterisation of the envelope proteins of pseudorabies virus. J. Virol. 52, 583-590.
7. Lukacs, N., Thiel, H.-J., Mettenleiter, T.C., Rziha, H.-J. (1985): Demonstration of three major species of pseudorabies virus glycoproteins and identification of a disulfide-linked glycoprotein complex. J. Virol 53, 166-173.
8. Murphy. F.A., Gibbs. E. P. J, Horzine. K. M. C, Studdert. M. J. (1999): Veterinary Virology. Academic press. pp: 555-569.
9. Timoney. J. F, Gillespie. J.H, Scott. F.W, Barlough, J.E. (1994): Hagan and Burner's Microbiology and infections diseases of domestic animals. 9 th Ed.