مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۴، ۳۱۷-۳۰۹

Original Article

Journal of Veterinary Research. 68,4:309-317, 2013

مطالعه ملکولی و بالینی شیوع هرپس ویروس تیپ ۱ و کلیسی ویروس در گربه‌های غیر واکسینه شهر تهران

امید مددگار [۱*] شهرام جمشیدی [۲] مهدیه درزی لمراسکی [۱] حمیده نجفی [۱] حسام الدین اکبرین [۳] احمد نازک تبار [۴]

۱) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ـ ایران

۲) گروه داخلی دام‌های کوچک، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ـ ایران

۳) دانش آموخته اپیدمیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ـ ایران

۴) دانشگاه تخصصی فن آوری‌های نوین آمل دانشکده دامپزشکی، آمل ـ ایران

(دریافت مقاله: ۲۸ خرداد ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۲ مهر ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه : هرپس ویروس وکلیسی ویروس گربه از عوامل اصلی در ایجاد بیماری بخش‌های فوقانی دستگاه تنفس می‌باشند و علی رغم واکسیناسیون گسترده علائم بالینی به صورت وسیع در جمعیت گربه‌ها دیده می‌شود. **هدف:** این مطالعه با هدف تعیین میزان آلودگی هرپس ویروس تیپ ۱ (FHV-1) وکلیسی ویروس گربه‌ها (FCV) در موارد مبتلا به علائم بیماری تنفسی و همچنین حیوانات سالم غیرواکسینه در تهران انجام شد. **روش کار:** بدین منظور سواب تنفسی و ملتحمه از ۱۶ گربه بیمار و ۲۶ سالم اخذ گردید. تکنیک‌های PCR و RT-PCR برای ردیابی ژنوم ویروس استفاده شد. **نتایج:** شیوع FCV در گربه‌های بیمار (۱۰۰٪) بیشتر از FHV (۴۳٪) بود و همچنین در موارد آلودگی به FCV علائم بالینی بسیار متنوع مشاهده گردید. در گربه‌های سالم و فاقد علامت بالینی شیوع این دو ویروس تقریباً برابر بود (هرکدام در حدود ۵۰٪). شایعترین علامت بالینی زخم قرنیه دو طرفی و برخلاف انتظار در حدود نیمی از مبتلایان به زخم قرنیه، FHV و جود نداشته و فقط FCV ردیابی شد. استوماتیت در نیمی از بیماران مشاهده گردید که همگی آلودگی به FCV داشتند. ۳۰٪ از حیوانات تحت مطالعه به عفونت همزمان با دو ویروس مبتلا بودند در حالیکه فقط نیمی از آنها دارای علائم بالینی بودند. **نتیجه‌گیری نهایی:** به نظر می‌رسد واریانت‌های جدید FCV حدت بیشتر داشته و توانایی ایجاد آسیب به سایر بافت‌ها از جمله قرنیه و ملتحمه را دارا بوده و نقش FCV در شیوع و وسعت چهره‌های بالینی به مراتب بیش از FHV است. نیز آلودگی به واریانتهای جدید FCV و FHV در بیماران و گربه‌های سالم بسیار بالاتر از نتایج مطالعات در نقاط دیگر دنیا می‌باشد و لزوم بازنگری در نوع واکسن و برنامه واکسیناسیون به خصوص در مورد کلیسی ویروس گربه‌ها مانند سایر کشورها احساس می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: زخم قرنیه، کلیسی ویروس گربه، هرپس ویروس گربه، شیوع، استوماتیت

مقدمه

بیماری بخش فوقانی دستگاه تنفس یک مشکل شایع کلینیکی در گربه‌ها در سراسر جهان است. عوامل بیماریزای اولیه اصلی را هرپس ویروس تیپ ۱ گربه و کلیسی ویروس گربه تشکیل می‌دهند. برد تلابرونکی سپتیکا از عوامل بیماریزای ثانویه به همراه دیگر میکرو ارگانیسم‌ها از جمله کلامیدو فیلا فلیس، مایکوپلاسماها و باکتری‌های هوازی موجود بر سطح ملتحمه بیشتر در ایجاد عفونت‌های چشمی موثرند (۱،۵). بنابراین در این مطالعه میزان آلودگی به هرپس و کلیسی ویروس به عنوان عوامل اولیه و شایع تر بیماری سندرم تنفسی فوقانی مورد بررسی قرار گرفت (۱،۲۲).

با اینکه واکسن علیه دو پاتوژن اصلی یعنی کلیسی ویروس و هرپس ویروس گربه در سراسر جهان به طور گسترده استفاده می‌شود، اما بیماری تنفسی و ضایعات چشمی به خصوص در بچه گربه‌ها و گربه‌هایی که به صورت دسته جمعی نگهداری می‌شوند (۱) همچنان یکی از مشکلات بالینی اصلی در این حیوانات است. یکی از دلایل این امر ممکن است ناشی از ایجاد ناقلین سالم در گربه‌های واکسینه شده باشد (۲۴).

همچنین گربه‌هایی که از مادران مبتلا به عفونت پایدار متولد می‌شوند می‌توانند در صورت کاهش ایمنی مادری بیماری مجددا دچار علائم بالینی شوند (۸).

هرپس ویروس گربه‌ها (FHV) یک DNA ویروس دو رشته‌ای، غشادار، متعلق به جنس واریسلا ویروس از تحت خانواده ی آلفا هرپس ویرینه می‌باشد (۲،۱۶). DNA ی ویروس غالبا به صورت اپی زوم و به ندرت به شکل ادغام شده در DNA ی سلول هایی که دچار عفونت پنهان شده‌اند وجود دارد و به واسطه ی استرس، ویروس مجدداً فعال شده و منجر به ایجاد عفونت‌های راجعه می‌گردد. محل اختفای ویروس معمولاً اعصاب سه قلوی صورت می‌باشد و ۸۰٪ گربه‌های بیمار پس از بیماری حامل می‌گردند که از اینها ۲۹٪ متناوباً ویروس را دفع می‌نمایند (۱۰،۲۸).

کلیسی ویروس گربه‌ها (FCV) یک RNA ویروس تک رشته‌ای سنس مثبت متعلق به خانواده‌ی کلیسی ویریده و جنس وزی ویروس می‌باشد. ویروس با آنکه دارای یک سروتیپ است اما تفاوت‌های ژنتیکی و آنتی ژنی میان سویه‌های مختلف منجر به تظاهرات فنوتیپی مختلف مثل حدت‌های متفاوت سویه‌ها می‌شود (۱۱). کپسید کلیسی ویروس نقش اساسی را در تفاوت‌های آنتی ژنیکی بین ایزوله‌های مختلف کلیسی

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۳-۰۲۱ نمابر: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱ Email: omadadgar@ut.ac.ir

ویروس دارد (۲۶). محتمل ترین فرضیه این است که چرخش ویروس در میان میزبان‌های متفاوت و به علت پاسخ ایمنی میزبان منجر به ایجاد موتان‌های فراری و یک انتخاب مثبت که توسط پاسخ ایمنی گربه‌های مبتلا به عفونت القامی شود، گردیده و در نتیجه منجر به ایجاد سویه‌های جدید شده که این پدیده‌ی تکاملی هر چند سبب بقای ویروس می‌گردد ولی می‌تواند توجیه کننده‌ی شکست تولیدات واکسنی علیه سویه‌ی وحشی کلیسی ویروس باشد (۱۵،۱۷). مبتلایان به کلیسی ویروس پس از بهبودی حامل ویروس گردیده و می‌توانند حتی تا ۲ سال دفع کننده مستمر ویروس باشند (۶،۱۵).

هرپس ویروس عامل اصلی التهاب بینی و نای در گربه‌ها -Feline Viral Rhinotracheitis (FVR) است. ویروس دارای تمایل بافتی به اپیتلیوم ملتحمه، قرنیه و بخش‌های فوقانی دستگاه تنفس و همچنین نوروسیت‌ها است (۳). اعصاب سه قلو محل اختفای ویروس می‌باشد (۳،۲۹). عفونت اولیه معمولاً در بچه گربه‌ها رخ می‌دهد و ۸۰٪ گربه‌ها پس از بهبودی دچار عفونت پنهان می‌شوند (۲۸).

در عفونت‌های هرپس ویروسی، بعد از دوره کمون ۲۴ تا ۴۸ ساعتی، بیماری حاد همراه با کنژیکتیویت دوطرفی، ترشحات موکوسی یا چرکی چشم، بینی، عطسه و سرفه ایجاد می‌شود. در موارد شدید اپیتلیوم ملتحمه نکروز شده و آسیب به اپیتلیوم قرنیه باعث ایجاد زخم می‌شود. علائم چشمی در عفونت‌های مزمن هرپس ویروسی شامل التهاب خفیف ملتحمه تا زخم‌های قرنیه، کراتیت، کراتوکنژیکتیویت است. راه اصلی انتقال ویروس تماس مستقیم بویژه از مادر به فرزند توسط ترشحات مخاطی است. همچنین ایجاد عفونت‌های دائمی به همراه دفع مداوم یا دوره‌ای ویروس گزارش شده است (۱۱). گربه‌های جوان به علت وجود حاملین و فاصله‌ای که بین حفاظت با واسطه‌ی آنتی بادی و کمبود ایمنی مادری و پاسخ به واکسیناسیون وجود دارد، نسبت به بیماری مستعدترند (۲۵).

در عفونت‌های کلیسی ویروسی بعد از دوره کمون ۶-۲ روزه علائم متنوعی از جمله کنژنکتیویت، رینیت، التهاب دهان به صورت حاد و مزمن، انتریت، برونکوپنومونی و لنگش ایجاد می‌شود. علائم سویه‌های با حدت کمتر محدود به دستگاه تنفس، محوطه دهانی و چشم‌ها می‌شود در حالی که سویه‌های حادتر منجر به پنومونی بینابینی در بچه گربه‌ها می‌شوند. پایدارترین ضایعه در عفونت‌های کلیسی ویروسی زخم‌های دهانی می‌باشند که به صورت وزیکول‌هایی که به سرعت پاره می‌شوند و زبان، لثه و کام سخت را درگیر می‌کنند ایجاد می‌شوند (۱۱). تفاوت در علائم بالینی ممکن است به تمایل بافتی سویه‌ی کلیسی ویروس مربوط باشد. همچنین به برخی از عوامل مرتبط با منشأ جغرافیایی نیز اشاره شده است (۲۶).

با توجه به وقوع موارد روزافزون بیماری بخش‌های فوقانی دستگاه تنفس در گربه‌ها علیرغم واکسیناسیون، این مطالعه با هدف بررسی شیوع ملکولی هرپس ویروس و کلیسی ویروس در گربه‌ها و ارتباط آن با علائم بالینی در عفونت‌های منفرد و یا توام انجام شد. از آنجا که طبق بررسی منابع تا کنون در ایران هیچ مطالعه‌ای در این مورد انجام نشده اهمیت موضوع بیشتر می‌شود.

مواد و روش کار

حیوانات تحت مطالعه: به منظور انجام این مطالعه از ۱۶ قلاده گربه مبتلا به علائم دستگاه تنفسی فوقانی شامل عطسه، سرفه، آبریزش از بینی و چشم، کنژیکتویت، زخم قرنیه، التهاب دهان، لثه و زبان که سن کمتر از ۶ ماه داشتند و همچنین ۲۶ قلاده گربه سالم با طیف سنی مختلف که به منظور معاینات دوره‌ای به بیمارستان دام‌های کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع شده بودند استفاده شد. هیچ یک از گربه‌ها سابقه واکسیناسیون نسبت به کلیسی ویروس و هرپس ویروس را نداشتند.

در مورد هر حیوان مشخصات لازم از قبیل جنس، سن، محل نگهداری (در داخل یا خارج خانه و امکان دسترسی به محیط خارج) و همچنین علائم بالینی مربوط به عفونت‌های دستگاه تنفس فوقانی (التهاب دهان و زبان یا لثه، زخم قرنیه، کنژیکتویت، عطسه، سرفه، آبریزش بینی، لنگش) مورد مطالعه و در فرم‌های مخصوصی که به منظور این مطالعه طراحی شده بود ثبت گردید.

نمونه‌برداری: در تمام حیوانات نمونه‌برداری با استفاده از سواب در نواحی ملتحمه و دستگاه تنفس انجام شد. نمونه‌ها در لوله‌های آزمایش استریل حاوی ۲mL بافر فسفات (PBS) در حداقل فرصت زمانی به آزمایشگاه منتقل گردید و بلافاصله در فریزر $-70^{\circ}C$ نگهداری شد.

بررسی مولکولی: برای ردیابی ژنوم ویروس از تکنیک PCR برای هرپس ویروس و RT-PCR برای کلیسی ویروس استفاده شد. به عنوان کنترل مثبت از واکسن زنده حاوی هر دو ویروس (Nobivac) استفاده شد و به عنوان کنترل منفی از آب مقطر استریل استفاده شد.

استخراج اسید نوکلئیک: اسیدنوکلئیک ویروس‌ها توسط کیت RNA و DNA ساخت شرکت Intron استخراج شد. در این کیت از تکنولوژی غشای سیلیکاژل استفاده شده است. به طور خلاصه پس از خارج کردن نمونه‌ها از فریزر و قرار دادن در دمای محیط به منظور خارج شدن از حالت انجماد، سواب‌ها به خوبی در بافر فسفات فشرده شد. سپس ۳۰۰ µL از بافر فسفات حاوی نمونه‌ی ویروس طبق پروتکل کارخانه سازنده به Lysis buffer ۵۰۰ µL افزوده شد، با ورتکس مخلوط گردیده، به آن پروتئیناز K افزوده گشت و در $55^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. در ادامه Binding buffer ۷۰۰ µL افزوده شد و به آرامی مخلوط شد. در مرحله بعد Washing buffer A ۵۰۰ µL اضافه شده و به مدت یک دقیقه در سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm قرار گرفت و مشابه این مرحله توسط buffer B Washing نیز تکرار گشت و در انتها Elution buffer ۳۰ µL افزوده شده و

پس از سانتریفوژ، نوکلئیک اسید استخراج شده جمع آوری می شد.

واکنش نسخه برداری معکوس: توسط کیت 2-steps RT-PCR شرکت Vivantis (Malaysia) انجام شد. به طور خلاصه ۸ µL از RNA تهیه شده در مرحله قبل با ۱ µL از پرایمر Random hexamer با غلظت ۵۰ng و ۱µL dNTPmix ۱۰ Mm مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای $65^{o}C$ و بعد از آن ۲ دقیقه در کنار یخ قرار داده می شد. سپس مخلوطی که حاوی ۰/۵µL M-Mulv RT (unit۱۰۰) و ۲/۵µL 10X Buffer M-Mulv و ۷/۵µL Nuclease-free water به آن افزوده شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $42^{o}C$ و ۱۰ دقیقه در دمای $85^{o}C$ انکوبه می گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز: در اینجا یکبار با روش Sykes و همکاران در سال ۲۰۰۱ که در آن از روش PCR چندگانه جهت تشخیص هرپس ویروس، کلیسی ویروس و کلامیدوفیلا پسیتاسی تنظیم شده است جهت تشخیص هرپس و کلیسی ویروس استفاده شد و بار دیگر جهت بالا بردن میزان احتمال تشخیص کلیسی ویروس از جفت پرایمر استفاده شده جهت تشخیص کلیسی ویروس در مطالعه Scansen و همکاران در سال ۲۰۰۴ همراه با جفت پرایمر مختص هرپس ویروس مطالعه Sykes و همکاران در سال ۲۰۰۱ به صورت PCR دوگانه و پس از بهینه سازی دمای چسبیدن پرایمر، استفاده شد که به علت اینکه در روش اول هیچکدام از نمونه ها در مورد کلیسی ویروس مثبت نبوده و نتایج هرپس ویروس هر دو روش نیز مشابه بود (پرایمر هرپس مشابه بود) شرایط دو واکنش دوم آورده می شود. شرایط واکنش PCR چندگانه اول عیناً مشابه مطالعه Sykes و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام شد.

به طور خلاصه میزان ۲/۵µL از 10X PCR buffer و ۰/۷۵ µL از 50mM Mgcl2 و ۰/۲۵µL از *Taq* DNA polymerase و ۱µL از ۱۰mM dNTP mix و ۱µL از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰mM به آن افزوده (پرایمر کلیسی مختص ژن p۳۰ از الگوی قرائت کننده ی یک ژنوم کلیسی ویروس و پرایمر هرپس مختص ژن تیمیدین کیناز بوده و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید) و توسط nuclease-free water به حجم ۲۲µL رسانده می شد و در انتها ۳µL از CDNA ساخته شده در مرحله قبل به آن اضافه شده و طبق برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر BIORAD قرار می گرفت. ابتدا ۵ دقیقه در دمای $94^{o}C$ مرحله واسرشت اولیه و سپس ۳۴ چرخه که هر کدام دارای ۳ مرحله باشند صورت می گرفت. ۱ دقیقه در $94^{o}C$ در پی آن ۱ دقیقه $53^{o}C$ و در آخر ۱ دقیقه $72^{o}C$ و پس از ۳۴ چرخه براین منوال، طویل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در $72^{o}C$ انجام می شد. در انتها محصولات PCR تحت ولتاژ ۱۰۰V به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی و رنگ بری، زیر نور ماوراء بنفش و در دستگاه ترانس ایلومیناتور مورد بررسی قرار می گرفت. ترادف پرایمرهای استفاده شده در مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت دست یابی به الگویی بالینی برای استفاده کلینسین ها، تجزیه و تحلیل ارتباط بین نتایج حضور هرپس ویروس تیپ ۱ و کلیسی ویروس گربه ها در بیماران با نوع علایم بالینی مشاهده شده در هر کدام انجام پذیرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS version 16.0 و آزمون های مربع کای (square-Chi) و آزمون دقیق فیشر (Fisher's exact test) انجام پذیرفت و سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

علائم بالینی: بارزترین علامت بالینی زخم قرنیه دو طرفی در (۱۱)۶۹٪ موارد بیماری و لنگش و آبریزش بینی کمترین و فقط در (۲)۱۲٪ موارد مشاهده شد. در درجات بعدی علایم بالینی، التهاب دهان و کونژکتیویت به ترتیب در ۵۰٪ و ۴۴٪ موارد و نیز التهاب لثه، عطسه و سرفه هرکدام ۳۱٪ موارد را شامل بودند.

واکنش RT-PCR/PCR: نتیجه واکنش RT-PCR کلیسی ویروس با جفت پرایمر مطالعه Sykes و همکاران در سال ۲۰۰۱ غیر از کنترل مثبت واکسن در تمام موارد سالم و بیمار منفی بود و باند مورد انتظار ۶۷۶bp در هیچ مورد مشاهده نشد. نتیجه واکنش PCR هرپس ویروس تیپ ۱ با پرایمرهای مطالعه Sykes و همکاران در سال ۲۰۰۱ باند ۲۹۲bp را و نتیجه واکنش RT-PCR کلیسی ویروس با پرایمرهای مطالعه Scansen و همکاران در سال ۲۰۰۴ حضور باند ۱۲۶bp را تایید نمودند. تصویر ۱ اندازه باندهای مورد نظر در موارد مثبت FCV، FHV و آلودگی با هر دو (واکسن دوگانه) نشان می دهد.

بر اساس نتایج بدست آمده در (۷)۴۳٪ از گربه های دارای علائم بالینی عفونت همزمان با هرپس ویروس و کلیسی ویروس وجود داشت و در (۹)۵۷٪ دیگر فقط آلودگی کلیسی ویروس ردیابی شد. به عبارتی تمام گربه های مبتلا به علائم بالینی دارای آلودگی کلیسی ویروس بودند. در حیوانات سالم نیز (۱۱)۴۲٪ آلودگی به کلیسی ویروس و (۱۴)۵۴٪ آلودگی به هرپس ویروس مورد تشخیص قرار گرفت. در (۶)۲۳٪ از سالم ها نیز آلودگی مشترک وجود داشته است. میزان شیوع و خصوصیات (جنس، سن و نحوه نگهداری) در گربه های بیمار و سالم به تفکیک در جدول ۲ قید شده است.

در ۵۴٪ از گربه های مبتلا به زخم قرنیه برخلاف انتظار هرپس ویروس ردیابی نشده و کلیسی ویروس ردیابی شد. در ۵۰٪ موارد بیماری استوماتیت مشاهده شد. علائم تنفسی ملایمتر شامل سرفه، عطسه و آبریزش از بینی در گربه هایی دیده شد که همگی از نظر وجود هرپس ویروس منفی بودند.

تجزیه و تحلیل آماری: به علت مثبت بودن آلودگی به FCV در تمام موارد بیماری، ارتباط معنی داری بین هیچکدام از علایم بالینی و آلودگی به FCV در بیماران به دست نیامد. در مورد آلودگی به FHV در گربه های بیمار، تنها درد و مورد و بین وجود سرفه و وجود عطسه با آلودگی به FHV با استفاده از آزمون دقیق فیشر رابطه آماری معنی داری وجود داشت

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده.

	Reverse	Forward	اندازه محصول	منبع
کلیسی ویروس	5'-GCACATCATATGCGGCTC-3'	5'-TGGATGAACTACCCGCCA-3'	۱۲۶	۲۱
کلیسی ویروس	5'-TTGAGAATTGAACACATCAATAGATC -3'	5'-TTCGGCCTTTTGTGTTCC -3'	۶۷۳	۲۳
هرپس ویروس	5'-CAACTAGATTTCCACCAGGA-3'	5'-GACGTGGTGAATATCAGC-3'	۲۹۲	۲۳

جدول ۲. میزان شیوع FCV و FHV و خصوصیات (جنس، سن و نحوه نگهداری) در گربه‌های بیمار و سالم.

	FCV	FHV	تعداد	شیوع	جنس نر	گربه‌های بالای ۶ ماه	نحوه نگهداری: خارج منزل	نحوه نگهداری: داخل منزل	نحوه نگهداری: هر دو
	+	+	۶	٪۲۳	٪۶۶	٪۶۶	٪۱۰۰	۰	۰
گربه‌های سالم	+	-	۵	٪۱۹	٪۸۳	٪۳۳	٪۵۰	٪۳۳	٪۱۷
	-	+	۸	٪۳۱	٪۷۱	٪۴۲	٪۴۲	٪۴۴	٪۱۴
	-	-	۷	٪۲۷	٪۷۱	٪۲۸	٪۵۷	٪۴۳	۰
گربه‌های بیمار	+	+	۷	٪۴۳	٪۴۲	۰	٪۴۲	٪۲۹	٪۲۹
	+	-	۹	٪۵۷	٪۵۶	۰	٪۵۶	٪۳۳	٪۱۱

($X^2=5/675, p<0/05$ or $p=0/034$) و این علایم در گربه‌های FHV منفی مشاهده شد.

همچنین بین وجود آلودگی به FCV، FHV یا هر دو با سن، جنس و شرایط نگهداری (داخل یا خارج خانه یا هر دو) در گربه‌های بیمار و سالم هیچ ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

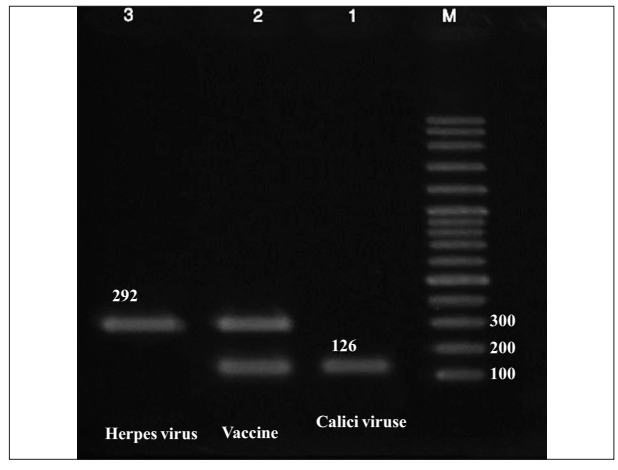
اهمیت بیماریهای تنفسی گربه‌ها و افزایش شیوع آن به خصوص در صورت نگهداری دسته جمعی گربه‌ها و حتی با وجود واکسیناسیون، بیانگر لزوم مطالعه در رابطه با عوامل ایجاد کننده این بیماریها و سایر عوامل موثر (فاکتورهای مربوط به میزبان و محیط) می‌باشد (۲۲). در مطالعه حاضر شیوع هرپس ویروس تیپ ۱ گربه و کلیسی ویروس گربه، عوامل اصلی ایجادکننده بیماری در دستگاه تنفس، در گربه‌های سالم و بیمار غیرواکسینه تعیین گردید. با توجه به مبنای کار ملکولی که ردیابی ژنوم ویروس بود و برای جلوگیری حتی الامکان ورود سویه واکسینال ویروس در مطالعه، نمونه‌برداری از جمعیت گربه‌های غیرواکسینه انجام شد و سایر فاکتورهای موثر از جمله سن، جنس و شرایط نگهداری لحاظ گردید. با لحاظ این نکته که علائم بیماری فقط در بچه گربه‌های زیر شش ماه بروز می‌کند و در نتیجه تمام گربه‌های بالای شش ماه که سالم هستند مشکوک به عفونت با این ویروس‌ها می‌باشند، جمعیت گربه‌ها ی مورد مطالعه به دو دسته زیر شش ماه بیمار و بالای شش ماهه‌ای که فاقد علامت بالینی اند اما ممکن است ناقل باشند تقسیم گردید.

از پاتولوژی استفاده نشد زیرا اولاً تهیه‌ی بیوپسی از بافت تنفس بسیار دشوار بوده و ثانیاً گنجیدگی هرپس ویروس موقت بوده و ممکن است در گربه بیمار مشاهده نشود و همینطور ممکن است گنجیدگی دیده شود اما علائم بیماری را شاهد نباشیم. بنابراین به علت فقدان علامت خاص دایمی پاتوگنومونیک، پاتولوژی کنار گذاشته شد. نیز از تکنیک کشت سلول استفاده نشد چون همانگونه که در نتایج مشاهده شد گربه‌هایی که از نظر وجود کلیسی و هرپس مثبت بودند اما از نظر بالینی کاملاً سالم بودند هم وجود داشتند و با تکیه بر مطالعه‌ای که توسط Sykes همکاران در سال ۱۹۹۷ و به طور مشابه Reubel و همکاران در سال ۱۹۹۳ انجام شد حساسیت PCR بیشتر از کشت گزارش شده است. همچنین Marsielo و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعاتی که در رابطه با تشخیص کلیسی ویروس انجام دادند دریافتند در موارد عفونت‌های راجعه و یا مزمن کلیسی ویروس تست ایمنوفلوئورسانس حساسیت کمتری در مقایسه با جداسازی ویروس دارد و باز بهترین روش را RT-PCR معرفی کردند که قادر به ردیابی حتی مقدار ناچیز ژنوم ویروس می‌باشد. بنابراین با توجه به اینکه دیگر تکنیک‌ها قادر به اضافه نمودن مزیت دیگری نبودند، تنها تکنیک مورد استفاده PCR و RT-PCR تعیین شد.

تمایز میان بیماری ایجاد شده توسط FCV و FHV بر طبق علائم بالینی تقریباً غیرممکن است و نیاز به روش‌های میکروبیولوژی دارد. تشخیص این عوامل ویروسی قبلاً بر پایه جداسازی ویروس در کشت سلول، فلوئورسانت آنتی بادی یا تست‌های سرولوژیک بود اما امروزه روش‌های بر پایه‌ی PCR سریعتر، حساس‌تر و مقرون به صرفه‌ترند.

نتیجه بررسی شیوع FCV و FHV که به ترتیب در سالم‌ها ۴۲٪ و ۵۴٪ مشخص شد در هر دو مورد در سطح بالای گزارشات دیگر جهانی است به طوریکه شیوع FCV بین ۲۹-۰٪ و FHV بین ۵۴-۰٪ در مطالعات مختلف گزارش شده است (۸،۱۰،۲۰). این نتیجه نشانگر آلودگی بالای محیطی نسبت به این دو عامل است. با توجه به مقاومت بالای FCV نسبت به عوامل محیطی از طرفی و حالت حامل آن از جهت دیگر در گربه‌های بهبود یافته و حتی واکسینه، و نیز حالت حامل در FHV، رعایت نکات بهداشتی توسط صاحبان حیوان شامل ضدعفونی مرتب جایگاه و وسایل و نیز جلوگیری از ارتباط حیوانات و وسایل مشکوک به آلودگی با بچه گربه جهت جلوگیری از آلودگی در چنین محیط آلوده‌ای بیش از بیش نمود پیدا می‌کند.

نیز شیوع FCV و FHV در بیماران به ترتیب ۱۰۰٪ و ۴۳٪ گزارش شد. نظر به اینکه در مطالعات مختلف شیوع FCV و FHV به ترتیب ۵۳-۲۰٪ و



تصویر ۱. اندازه‌باندهای مورد نظر در موارد مثبت FCV، FHV و آلودگی با هر دو (واکسن دو گانه). M: مارکر ۱۰۰bp، ۱: نمونه مثبت FCV، ۲: واکسن حاوی هر دو ویروس (کنترل مثبت)، ۳: نمونه مثبت FHV.

۳۴-۱۰٪ در مبتلایان به بیماریهای تنفسی گزارش شده است بنابراین در این مورد هم بالاتر از دیگر مطالعات است (۲۳). این مسئله به خصوص در مورد FCV نمود پیدا می‌کند که ۱۰۰٪ شیوع آن بوده است.

در مطالعات مختلف عنوان شده که پروتئین کپسید FCV که لیگاند ویروس نیز در همین ناحیه می‌باشد دارای یک منطقه فوق العاده تغییر پذیر می‌باشد که اتفاقاً تغییرات در همین منطقه سبب ایجاد موتان فراری ویروس و فرار از سد ایمنی گربه‌های ایمن (چه در اثر واکسیناسیون و چه بیماری) می‌گردد و در نتیجه در هر کشور و در هر منطقه پس از مدتی آنچنان تغییرات بالایی مشاهده می‌شود که امکان دارد سویه تغییر یافته کاملاً جای سویه‌های قبلی را گرفته و غالب گردد. در اینجاست که امکان دارد تأثیر واکسن هم به شدت کاهش یافته یا بی‌اثر گردد. به همین دلیل در منابع جدید پایش مداوم سویه‌های در گردش هر منطقه و بررسی تأثیر واکسن جهت تغییر نوع واکسن استفاده در واکسیناسیون از طرفی و استفاده از واکسن‌های مولتی والان که چندین سویه را شامل باشند توصیه می‌گردند (۱۱،۱۵،۲۳). نیز محققین آلودگی بالا به ویروس‌های سرکوب کننده ایمنی گربه‌ها (FIV) و لوسمی گربه‌ها (FeLV) در یک منطقه را عامل بالا رفتن شیوع FCV می‌دانند (۱۲،۲۷). ابتلای گربه‌ها به سایر عفونت‌های ویروسی گربه‌ها مانند ویروس کمبود ایمنی گربه، ویروس لوسمی گربه، ویروس پریتونتیت عفونی گربه که همه منجر به اختلال در عملکرد سیستم ایمنی گربه‌ها می‌شوند نقش موثری در پاسخ گربه به بیماری دستگاه تنفس دارد. برخی از محققین مانند Reubel و همکاران در سال ۱۹۹۲ در کالیفرنیا روی واکنش بین عفونت‌های با FHV-۱ و FIV مزمن در گربه‌های عاری از پاتوژنی که به طور تجربی عفونی شدند انجام دادند و دریافتند که گربه‌هایی که تحت تأثیر FIV قرار گرفته‌اند نسبت به آنهایی که به عفونت FIV آلوده نشده‌اند بیشتر بیمار شده‌اند. نیز در مطالعه‌ای توسط Tenorio و همکاران در سال ۱۹۹۰ در کالیفرنیا به منظور تعیین عفونت مزمن با FIV، FCV و FeLV انجام شد، مشخص شد که گربه‌های آلوده به FIVای که مبتلا به عفونت‌های FCV یا FCV به همراه FeLV هستند دارای بیشترین شیوع عفونت‌های حفره دهان و شدیدترین زخم‌های دهانی هستند. با توجه به جمیع مطالب فوق به نظر می‌رسد چنین شیوع بالایی از FCV با توجه به واکسیناسیون گسترده در منطقه، علاوه بر آلودگی بالای محیط، احتمال ناکارایی واکسن به علت تغییرات ژنتیکی سویه در گردش و نیز وجود احتمالی بیماریهای همراه سرکوب کننده ایمنی باشد که مطالعات تکمیلی را طلب می‌کند.

از آنجائی که در این مطالعه نتیجه هیچکدام از موارد RT-PCR با استفاده از پرایمر Sykes و همکاران در سال ۲۰۰۱ مثبت نبوده و نیز این مطلب بار دیگر در سال ۲۰۰۸ و در مطالعه انجام شده توسط Kang و همکاران در سال ۲۰۰۸ در کشور کره مشاهده شده که هیچکدام از ۷۸ گربه هیچگونه آلودگی نداشتند که با توجه به شرایط موجود آن منطقه برای نویسنده مقاله هم عجیب بوده است، به نظر می‌رسد طیف تغییرات در سویه‌های در گردش در مطالعه ما آنچنان بالا بوده که با پرایمرهای مطالعه Sykes و همکاران در سال ۲۰۰۱ هیچ نتیجه‌ای در بر نداشته ولی زمانیکه از پرایمر مطالعه Scansen و همکاران در سال ۲۰۰۴ استفاده می‌شود شیوع ۱۰۰٪ حاصل می‌گردد. در تایید این مطلب گزارشات نشان می‌دهد که هیچ پرایمری تا به حال قادر به تشخیص کلیه سویه‌های FCV موجود حتی در بانک ژن هم نشده است (۷). نتیجه اینکه به نظر می‌رسد اولاً پرایمرهای مطالعه Sykes و همکاران در سال ۲۰۰۱ کارایی چندانی حداقل در این منطقه ندارد و ثانیاً تغییرات در کشور با توجه به فشار واکسیناسیون از طرفی و خصوصیات منحصر بفرد ویروس FCV که در مطالعات متعدد به آن اشاره شده است از طرفی دیگر، تغییرات در سویه‌های در گردش را چنان بالا ببرد که لزوم مطالعه وسیع در مورد کارآیی واکسن‌های موجود علیه FCV در ایمن سازی را آشکارتر می‌سازد.

در تقریباً نیمی از بیماران مبتلا به زخم قرنیه هرپس ویروس ردیابی نشد. با توجه به اینکه هرپس ویروس را عامل اصلی در ایجاد زخم‌های قرنیه می‌دانند (۱۰،۱۱) این نتیجه یا به دلیل دفع پریودیک هرپس است که هنگام نمونه برداری در ترشحات حضور نداشته یا به دلیل وجود واریانت‌های جدید کلیسی ویروس است که برخلاف سویه‌هایی که قبلاً وجود داشته، به تنهایی و بدون کمک هرپس ویروس قادر به ایجاد زخم قرنیه است. مشابه نتایج ما در مطالعه‌ای که توسط Sykes و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد دیده شد و از هیچ‌یک از ۴ گربه مبتلا به زخم قرنیه هرپس ویروس جدا نگشت. نیز در مطالعه‌ای که توسط Nasisse و همکاران در سال ۱۹۹۸ با عنوان ردیابی DNA هرپس ویروس در گربه‌های مبتلا به زخم قرنیه یا کراتیت ائوزینوفیلیک انجام شد که در آن از ۱۵۶ گربه مبتلا به زخم قرنیه در ۵۵٪ موارد هرپس ویروس ردیابی شد و در بقیه نشد.

در ۵۶٪ گربه‌های بیمار هرپس ردیابی نشد اما کلیسی ویروس در همه موارد بیماری یافت شد. در توجیه این مسئله می‌توان هم چنین به

مقاومت بالای کلیسی ویروس در مقابل هرپس ویروس اشاره کرد به طوری که کلیسی ویروس به طور مداوم طی دوره بیماری و به طور عمده از طریق تجهیزات، تماس مستقیم بین گربه‌ها و گاها در مسافت‌های کوتاه توسط ریزقطرات منتقل می‌شود و به دلیل اینکه فاقد غشاست مقاومت بالایی در محیط دارد و معمولاً فقط توسط هیپوکلریت سدیم می‌توان ضدعفونی محیط و لوازم را انجام داد در حالیکه هرپس واجد غشا و دارای مقاومت کمی در محیط بوده و همچنین به دلیل دفع متناوب و نه دائمی آن و اختفای ویروس در اعصاب ژنوم آن در نمونه‌های ما یافت نشد (۱۱).

طبق مطالعه‌ای که توسط Harbour و همکاران بین سال‌های ۱۹۸۰ تا ۱۹۸۹ انجام شد نیز نتایجی مشابه کار ما یافت شد و از ۱۱۸۰ گربه مبتلا به بیماری حاد بخش فوقانی دستگاه تنفس ۲۹/۵٪ کلیسی ویروس و ۱۳/۷٪ آنها هرپس ویروس را دفع می‌کردند. نیز مشابه نتایج ما در مطالعه‌ای که بین مارس ۲۰۰۵ و آگوست ۲۰۰۶ در لیژ بلژیک توسط Zicola و همکاران در سال ۲۰۰۹ به منظور تعیین شیوع هرپس ویروس و کلیسی ویروس گربه در یک جمعیت ناهمگون از گربه‌هایی که در پناهگاه زندگی می‌کردند انجام شد میزان شیوع FCV ۳۳/۱٪ و FHV-1 ۲۰/۱٪ به دست آمد. در حالیکه میزان شیوع عفونت همزمان با هر دو ویروس ۱۰٪ شد.

همچنین در پژوهشی که توسط Folkers و همکاران در سال ۲۰۰۲ روی جمعیتی از گربه‌ها که در آنها بیماری تنفسی اندمیک بود در هلند انجام شد، در گربه‌های بیمار از ۵۹٪ موارد FCV و از ۳۹٪ موارد FHV جدا گردید و ۲۶٪ از موارد مبتلا به عفونت همزمان با هر دو ویروس بودند. همچنین در مطالعه اپیدمیولوژیکی که در ژانویه سال ۲۰۰۰ در ژاپن توسط Mochizuki و همکاران در مورد عفونت‌های تنفسی فوقانی در گربه‌ها صورت گرفت، ۲۱/۶٪ آنها مبتلا به FCV و ۳/۶ آنها مبتلا به رینوتراکئیت ویروسی گربه بودند و در تمام این مطالعات نیز شیوع کلیسی ویروس در گربه‌های بیمار بیشتر از هرپس ویروس بود.

دیگر مقایسه‌ای که بین این مطالعه و سایرین انجام شده در رابطه با قیاس شیوع کلیسی ویروس و هرپس ویروس در گربه‌های سالم و بیمار می‌باشد. شیوع کلیسی ویروس در مطالعه ما همانند مطالعات ذکر شده در بیماران بیشتر از گربه‌های سالم است. اما شیوع هرپس ویروس بین گربه‌های بیمار و سالم تفاوت چندانی ندارد، برخلاف سایر تحقیقات که در آن بیماران نسبت به سالم‌ها از شیوع به مراتب بالاتری برخوردارند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط Helps و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام شد شیوع کلیسی ویروس در گربه‌های بیمار ۴۷٪ و در سالم‌ها ۲۹٪ و شیوع هرپس ویروس در بیماران ۱۶٪ و در سالم‌ها ۸٪ گزارش شد. حال آنکه اعداد به دست آمده در کار ما به ترتیب ۱۰۰٪ و ۴۲٪ برای FCV و ۴۳٪ و ۵۴٪ برای FHV بوده است. همچنین کاری که توسط Stiles و همکاران در آپریل سال ۱۹۹۷ در دانشکده دامپزشکی جورجیا در ایالات متحده انجام شد شیوع هرپس ویروس در بیماران ۵۴٪ و در گربه‌های سالم ۱۲٪ گزارش شد. در توجیه این مطلب به نظر می‌رسد همانطور که در دیگر مطالعات هم ذکر شده روش PCR آنچنان حساس است که در ویروسی مانند هرپس ویروس که حالت حامل ایجاد می‌کند در تمایز بین سالم و بیمار ناتوان بوده و به دلیل حساسیت بالا محققین را به اشتباه می‌اندازد (۲۰،۲۹).

در مطالعه آماری در بیماران به علت شیوع ۱۰۰٪ کلیسی ویروس ارتباط معنی‌داری بین حضور علایم مختلف و FCV یافت نشد ولی وجود عطسه و سرفه با عدم تشخیص FHV معنی‌دار تشخیص داده شد. از آنجایی که سرفه و عطسه تظاهرات خفیف بیماری تنفسی است، به نظر می‌رسد چنان که دیگر پژوهشگران هم گزارش نموده‌اند FHV سبب تظاهرات شدیدتر شده و وجود تظاهرات خفیفی مانند سرفه و عطسه بیشتر به آلودگی به FCV منتسب است که این مطلب می‌تواند کلید مناسبی به کلینسین‌ها جهت تشخیص در کشور ارائه نماید (۲۰).

در حیوانات بیمار و سالم از نظر سن و نحوه نگهداری و جنسیت بین مطالعه ما و سایرین تفاوت‌های معنی‌داری وجود نداشت بنابراین به نظر می‌رسد اینگونه توزیع هرپس و کلیسی ویروس بین بیماران و سالم‌ها احتمالاً معنی‌دار نبوده و بیشتر مربوط به نحوه و زمان دفع ویروس می‌باشد.

۳۱٪ از کل گربه‌ها همزمان هرپس و کلیسی مثبت بودند که در حدود نیمی از اینها علائم بیماری مشاهده شد. بیماران همه زیر شش ماه سن داشتند و در سالم‌ها ۶۶٪ بالای شش ماه و بقیه زیر شش ماه بودند که احتمالاً به دلیل ویژگی‌های انفرادی در ایمنی و یا شاید مواجهه با سویه‌ی کم حدت ویروس توانستند مقاومت کنند. این موضوع در مطالعات دیگر هم به نوعی مشاهده شده چنانکه در مطالعه‌ای که توسط Harbur و همکاران در سال ۱۹۹۱ انجام گردید ۵۱/۳٪ از ۸۷۲ گربه دفع کننده کلیسی ویروس و ۶۵/۷٪ از ۲۱۳ گربه دفع کننده هرپس ویروس زیر یک سال سن داشتند (جمعیت گربه‌ها شامل گربه‌های سالم و بیمار بود). این مطالب نشانگر آنست که حتی آلودگی به هر دو ویروس هم می‌تواند نشانه بیماری نباشد که خود بیانگر دشواری و دقت کار تشخیصی هنگام بررسی بیماریهای تنفسی گربه‌هاست.

در پایان چنانکه به نظر می‌رسد کلیسی ویروس نقش مؤثرتری را در بیماریهای تنفسی گربه‌ها بازی می‌کند. پیشنهاد می‌شود علاوه بر بررسی وجود کلیسی ویروس و هرپس ویروس، خون گربه‌ها به منظور ردیابی ویروس ایدز گربه و ویروس لوسمی گربه بررسی گردد بلکه شاید بتوان طیف وسیع و شدید علائم را به اختلال در عملکرد ایمنی بدن نسبت داد و همچنین نمونه‌برداری به طور دوره‌ای از گربه‌های بیماری که هرپس ویروس در آنها ردیابی نشد جهت حصول اطمینان از حضور یا عدم حضور ویروس انجام گردد و پس از تعیین ترادف سویه‌های در گردش و مقایسه با واکسن، کارایی واکسن موجود را بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی

دانشگاه تهران (در قالب طرح‌های شماره ۲۸۰۸۸/۶/۴ و ۲۸۰۸۸/۶/۵) انجام شده و مولفین تقدیر و تشکر خود را از این معاونت و نیز از آقایان مهندس محمدمهدی غفاری، مهندس ایرج اشرافی و مهندس محمود خرمالی جهت کمک‌های بی دریغ ایشان اعلام می‌دارند.

References

1. Dawson, S., Willoughby, K., Gaskell, R.M., Wood, G., Chalmers, W.S.K. (2001) A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleukopenia virus in 6-week-old kittens. J Feline Med Surg. 3: 17-22.
2. Gaskell, R., Dawson, S., Radford, A., Thiry, E. (2007) Feline herpesvirus. Vet Res. 38: 337-54.
3. Gaskell, R.M., Dennis, P.E., Goddard, L.E., Cocker, F.M., Wills, J.M. (1985) Isolation of felid Herpesvirus 1 from the trigeminal ganglia of latently infected cats. J Gen Virol. 66: 391-4.
4. Harbur, D.A., Howard, P.E., Gaskell, R.M. (1991) Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. Vet Rec. 128: 77-80.
5. Hartmann, A.D., Hawley, B., Werckenthin, C., Lappin, M.R., Hartmann, K. (2010) Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. J Feline Med Surg. 12: 775-782.
6. Helps, C.R., Lait, P., Damhuis, A., Björnehammar, U., Bolta, D., Brovida, C., Chabanne, L., Egberink, H., Ferrand, G., Fontbonne, A., Pennisi, M.G., Gruffydd-Jones, T., Gunn-Moore, D., Hartmann, K., Lutz, H., Malandain, E., Möstl, K., Stengel, C., Harbour, D.A., Graat, E.A.M. (2005) Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydophila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. Vet Rec. 156: 669-673.
7. Helps, C., Lait, P., Tasker, S., Harbour, D. (2002) Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR. J Virol Meth. 106: 241-44.
8. Holst, B.S., Berndtsson, L.T., Englund, L. (2005) Isolation of feline herpesvirus-1 and feline calicivirus from healthy cats in swedish breeding catteries. J Feline Med Surg. 7: 325-331.
9. Johnson, R.P., Povey, R.C. (1984) Feline Calicivirus infection in kittens borne by cats persistently infected with the virus. Res Vet Sci. 37: 114-119.
10. Kang, B.T., Park, H.M. (2008) Prevalence of feline herpesvirus 1, feline calicivirus and *Chlamydophila felis* in clinically normal cats at e Korean animal shelter. J. Vet. Sci. 9: 207-209.
11. Maclachlan, N.J., Dubovi, E.J. (2011) Fenner's Veterinary Virology. James, N., Edwar, J. (eds.). (4th ed.) Academic Press. New York, California, USA.
12. Marsilio, F., Martino, B.D., Decaro, N., Buonavojlia, C.A. (2005) Novel nested PCR for the diagnosis of Calicivirus infections in the cat. Vet Microbiol. 105: 1-7.
13. Mochizuki, M., Kawakami, K., Hashimoto, M., Ishida, T. (2000) Recent epidemiological status of feline upper respiratory infections in Japan. J Vet Med Sci. 62: 891-893.
14. Nasisse, M.P., Glover, T.L., Moore, C.P., Weigler, B.J. (1998) Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration. Am J Vet Res. 59: 856-858.
15. Ohe, K., Sakai, S., Sunaga, F., Murakami, M., Kiuchi, A., Fukuyama, M., Furuhata, K., Hara, M., Soma, T., Ishikawa and Taneno, A. (2006) Detection of Feline calicivirus (FCV) from vaccinated cats and phylogenetic analysis of its capsid genes. Vet Res Commun. 30: 293-305.
16. Pedersen, N.C. (1987) Feline Herpesvirus type 1. In: Virus Infection of Carnivores. Appel, M.J. (ed.). (1st ed.) Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands. p. 227-237.
17. Radford, A.D., Dawson, S., Ryvar, R., Coyne, K., Johnson, D.R., Cox, M.B., Acke, E.F., Addie, D.D., Gaskell, R. M. (2003) High genetic diversity of the immunodominant region of feline calicivirus capsid

gene in endemically infected cat colonies. Virus Gen. 27: 145-55.

18. Rampazzo, A., Appino, S., Pregel, P., Tarducci, A., Zini, E., Biolatti, B. (2003) Prevalence of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus 1 in cats with conjunctivitis in northern Italy. J Vet Intern Med. 17: 799-807.
19. Reubel, G.H., George, J.W., Barlough, J.E., Higgins, J., Grant, C.K., Pedersen, N.C. (1992) Interaction of acute feline herpesvirus-1 and chronic feline immunodeficiency virus infections in experimentally infected specific pathogen free cats. Vet Immunol Immunopathol. 35: 95-119.
20. Reubel, G.H., Ramos, R.A., Hickman, M.A., Rimstad, E., Hoffermann, D.E., Pedersen, N.C. (1993) Detection of active and latent feline herpes virus 1 infection using the polymerase chain reaction. Arch Virol. 132: 409-420.
21. Scansen, B.A., Wise, A.G., Kruger, J.M., Venta, P.J., Maes, R.K. (2004) Evaluation of a p30 gene-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for detection of feline caliciviruses. J Vet Intern Med. 18: 135-138.
22. Stiles, J., McDermott, M., Willis, M., Roberts, W., Greene, C. (1997) Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis. Am J Vet Res. 58: 804-807.
23. Sykes, J.E., Allen, J.L., Studdert, V.P., Browning, G.F. (2001) Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamidia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. Vet Microbiol. 81: 95-108.
24. Sykes, J.E., Anderson, G.A., Studdert, V.P., Brown, G.F. (1999) Prevalence of feline *Chlamydia psittaci* and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. J Vet Intern Med. 13: 153-162.
25. Sykes, J.E., Browning, G.F., Anderson, G., Studdert, V.P., Smith, H.V. (1997) Differential sensitivity of culture and the polymerase chain reaction for detection of feline herpesvirus 1 in vaccinated and unvaccinated cats. Arch Virol. 142: 65-74.
26. Sykes, J.E., Studdert, V.P., Browning, G.F. (1998) Detection and strain differentiation of feline calicivirus in conjunctival swabs by RT_PCR of hypervariable region of capsid protein gene. Arch Virol. 143: 1321-1334.
27. Tenorio, A.P., Franti, C.E., Madewell, B.R., Pedersen, N.C. (1991) Chronics oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici virus, immunodeficiency, or leukemia viruses. Vet Immunol Immunopathol. 29: 1-14.
28. Vogtlin, A., Fraefel, C., Albini, S., Leutenegger, C.M., Schraner, E., Spiess, B., Lutz, H., Ackermann, M. (2002) Quantification of feline herpesvirus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time Taqman PCR. J Clin Microbiol. 40: 519-523.
29. Zicola, A., Saegerman, C., Quatpers, D., Viandier, J., Thiry, E. (2009) Feline herpesvirus 1 feline calicivirus infections in heterogeneous cat population of a rescue shelter. J Feline Med Surg. 11: 1023-27.

A molecular and clinical survey of feline herpesvirus-1 and feline calicivirus prevalence in non-vaccinated cats in Tehran, Iran

Madadgar, O.[1*], Jamshidi, Sh.[2], Darzi Lamraski, M.[1], Najafi, H.[1], Akbarein, H.[3], Nazaktabar, A.[4]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Univrersity of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Univrersity of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Univrersity of Tehran, Tehran-Iran*

[4]*Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol-Iran*

(Received 17 June 2013 , Accepted 23 September 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Despite the widespread use of vaccines against feline herpesvirus type1 (FHV_1) and feline calicivirus (FCV), clinical signs are still seen in cat population. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to determine the prevalence of FHV-1 and FCV in non vaccinated clinically healthy cats and cats with URTD. **METHODS:** Oropharyngeal and conjunctival swabs were taken from 16 cats with clinical signs of URTD and 26 clinically healthy cats. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and polymerase chain reaction (PCR) were performed to diagnose FCV and FHV-1 infections. **RESULTS:** In cats with URTD, the prevalence rate of FCV (100%) was higher than FHV-1(43%) but in clinically normal cats the prevalence rate of both viruses was about 50%. Clinical signs in cats with FCV was more various than FHV. Also, the prevalence of both viruses co-infection was 30% and half of them showed clinical disease. The results indicated higher rate of both viruses infection especially FCV in domestic cats in Tehran in comparison with other regions. Stomatitis was seen in 50% of cats with URTD. In 50% of cats with corneal ulcers, contrary to our expectations, FCV was detected not FHV-1. **CONCLUSIONS:** It seems that new variants of calicivirus are more virulent and are able to damage other tissues like cornea and conjunctiva. FCV tends to produce more clinical signs than FHV. Also, infection with new variants of FCV and FHV-1 in healthy cats and cats with URTD is much higher than other regions of the world. Therefore, a revision of vaccines and vaccination program, especially for FCV has become a matter of necessity just like other countries.

Key words: corneal ulcer, feline calicivirus, feline herpesvirus, prevalence, stomatitis

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Various character of used primers.

Table 2. Frequency of FCV and FHV-1 and various parameters (sex, age, inside or outside the home) in healthy and affected catss.

Figure 1. Band sizes of positive samples and control of PCR for FCV and FHV-1. M: 100bp marker, 1: Positive sample of FCV, 2: Vaccine (positive control of FCV and FHV-1), 3: Positive sample of FHV-1.

***Corresponding author's email: omadadgar@ut.ac.ir, Tel: 021-61117053, Fax: 021-66427517**