

دو فصلنامه هیستوبیولوژی دامپزشکی

دوره دهم شماره یک بهار و تابستان ۱۴۰۱

مقایسه کیت ایمونوکروماتوگرافی تشخیص با PCR در تشخیص بیماری دیستمبر در سگ

مرتضی رزاقی منش^{۱*}، رضا نقی ها نجف آبادی^۲، یاسمن نورزاده^۳، آیدا شریفیان^۴، زهرا صادقیان^۴

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، خوزستان، ایران

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، یاسوج، ایران

۳- دانش آموخته دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، ایران

۴- دانشجوی دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، ایران

*نویسنده مسئول: Morteza_vet@yahoo.com

چکیده

بیماری ویروسی دیستمبر به صورت مسری است و دستگاه‌های مختلف بدن را تحت تاثیر قرار میدهد، عمدتاً از طریق دستگاه تنفسی وارد میشود. مقایسه کیت ایمونوکروماتوگرافی با PCR در تشخیص دیستمبر در سگ، بر اساس مراجعین کلینیک‌های دام کوچک شهرستان کرج می‌باشد. در ابتدا حیوانات دارای علائم بالینی مانند ترشحات بینی و چشم یا علائم گوارشی و عصبی شناسایی شدند و کیت تشخیصی الایزا برای آنها گذاشته شد. در مرحله بعد فارغ از نتیجه کیت نمونه‌های جمع‌آوری شده از ترشحات مخاطی توسط سوآپ استریل در درون محلول PBS استریل جهت بررسی مولکولی جمع‌آوری شدند. در نهایت با استفاده از روش راپید تست و PCR نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و داده‌های به‌دست‌آمده آنالیز آماری شدند. نتایج مطالعه نشان داد روش تشخیصی (رپید تست: ۳/۳۴ و PCR: ۹/۴۲ درصد مثبت) و جنسیت سگ‌ها (در رپید تست: ۲۵/۷۱ درصد، ماده ۸۹/۷ درصد؛ در PCR: ۲۰ درصد و ماده ۸۵/۲۲ درصد مثبت) بر تشخیص دیستمبر تاثیرگذارند. آلودگی در سگ‌های بومی (رپید تست: ۱۴/۵۷ درصد و با روش PCR: ۴۲/۳۱ درصد مثبت) نسبت به سگ‌های نژاد دار (با رپید تست ۸۶/۴۲ درصد و با روش PCR: ۴۳/۱۱ درصد مثبت) بیشتر بود. همچنین نتایج بدست‌آمده در مطالعه حاضر حاکی از آن بود که ۱۴/۵۷ درصد از کل سگ‌ها دارای اسهال و استفراغ هم‌زمان بودند. همچنین نتیجه مثبت با آزمون PCR در سگ‌هایی با اسهال و استفراغ ۵۷/۸ درصد بود. با توجه به شیوع قابل توجه بیماری دیستمبر در سگ‌ها، انجام واکسیناسیون و رعایت موازین بهداشتی توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: دیستمبر، سگ، ایمونوگرافی، PCR

مقدمه

ویروس دیستمبر سگ، متعلق به کلاس موربیلی ویروس و عضو خانواده Paramyxoviridae است. سگ های جوان، واکسینه نشده و سگ های پیری که ایمنی بدنشان ضعیف شده، مستعد این بیماری می باشند (۱).

ویروس دیستمبر در سراسر جهان دیده میشود (۲)؛ اغلب توله های ۳ تا ۶ ماه را مبتلا می کند و بیشترین آمار مرگ و میر متعلق به این گروه است، اما سگ های واکسینه نشده ی مسن نیز در خطر ابتلا قرار دارند. این ویروس همچنین سگ سانان و برخی حیوانات دیگر مانند راکون، پاندای قرمز، راسو، گورکن ها، گراز وحشی و حتی گربه سانان بزرگ جثه مثل شیر را آلوده میکند (۳). اما در گربه های اهلی ایجاد بیماری نمیکند (۴ و ۵). همچنین گزارش شده که این ویروس می تواند در بدن انسان بدون هیچ علامتی وجود داشته باشد.

بیماری دیستمبر بیشترین و کشنده ترین بیماری در بین سگ ها، در نیمه قرن بیستم بود. این بیماری در سگ ها یک عفونت سیستمیک است که دستگاه های مختلفی از جمله گوارشی، تنفسی، عصبی، پوست و چشم را درگیر کرده و علائم بالینی متنوعی ایجاد می نماید. انتقال ویروس عمدتاً از طریق ترشحات تنفسی، تماس با ادرار یا مدفوع و تماس مستقیم یا غیرمستقیم با وسایل حیوان آلوده صورت میگیرد. پس از ورود، ویروس ابتدا در لوزه و غده لنفاوی تکثیر یافته و سپس به سایر اندام ها گسترش میابد (هدلی و همکاران، ۲۰۱۳).

دوره نهفتگی بیماری ۷ تا ۱۴ روز است (۶ و ۷). ویروس عامل بیماری دیستمبر با حمله به گلبول های سفید و تأثیر گذاشتن بر روی سیستم لنفاوی باعث از پا افتادن حیوان می شود. این ویروس به سرعت در اثر نور آفتاب، حرارت و مواد ضدویروسی از بین می رود اما در سرما به خوبی دوام می آورد و اکثراً در فصول پاییز و زمستان پدیدار می شود.

علائم اصلی این بیماری شامل تب شدید، ترشحات بینی و چشم، التهاب چشم، بی حالی و درگیری احتمالی چندین ارگان، به ویژه دستگاه عصبی، است که میتواند دوره بیماری را طولانی کند (۸). ویروس دیستمبر به سرعت از طریق ذرات دفع شده در عطسه و سرفه منتقل شده و طی ۲ تا ۵ روز کل بدن را درگیر میسازد. پس از تأثیر اولیه بر غدد لنفاوی، ویروس در روز ۶ تا ۹ در خون قابل شناسایی است و به ترتیب سیستم های تنفسی، گوارشی و عصبی را آلوده میکند. بیماری عمدتاً در توله سگ ها با پایان یافتن ایمنی پادتن مادری مشاهده میشود. ویروس همه سیستم بدن را درگیر می کند. علائم اولیه شامل تب، افسردگی شدید و ریزش موی گسترده از هفته اول بروز میابد و ویروس در محیط بیرونی ناپایدار بوده و طی چند روز از بین می رود.

این ویروس بیرون از بدن میزبان در محیط به سرعت از بین می رود. در صورت بقا تا حدود ۲ هفته، احتمال تشکیل آنتی بادی و بهبود افزایش میابد (۸ و ۹). از علائم شاخص بیماری دیستمبر میتوان به ترشحات چرکی اطراف چشم، بی اشتها و پوسته پوسته شدن کف پاها اشاره کرد. شدت

و تظاهر علائم در هر سگ متفاوت است و در مواردی، به ویژه در سگ‌های مسن ممکن است علائم خفیف یا نا مشخص باشد. درگیری سیستم عصبی اغلب عامل اصلی مرگ و میر بوده و ممکن است منجر به نابینایی یا اختلال در حرکت شود. پس از روز دهم در سگ‌های مقاوم، پاسخ ایمنی آغاز شده و با تولید آنتی‌بادی، حیوان نسبت به بیماری ایمن می‌گردد (۱۰).

تشخیص دیستمبر از طریق کاهش لنفوسیت‌ها در آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنالیز ادرار صورت می‌گیرد. تست‌های سرولوژی، شناسایی آنتی‌ژن‌های ویروسی در ترشحات و تصویربرداری‌هایی چون؛ رادیوگرافی (فقط برای تشخیص محل عفونت)، سی‌تی‌اسکن و MRI به منظور ارزیابی ضایعات عصبی نیز کاربرد دارند. موی روی پوست، موکوس بینی و اپیتلیوم کف پا نیز می‌تواند برای آنتی‌بادی مورد آزمایش قرار بگیرد (۱۱ و ۱۲).

در مراحل پیشرفته بیماری، کنترل التهاب ریوی و پیشگیری از دهنراشه شدن حیوان در اثر اسهال الزامی است.

همچنین پایش مداوم سیستم عصبی مرکزی به منظور شناسایی تشنج و سایر اختلالات اهمیت دارد. شانس زنده ماندن یک سگ بیمار به گونه ویروس و قدرت سیستم ایمنی بدن سگ، بستگی دارد.

بهبود کامل امکان پذیر است؛ اگرچه تشنج و دیگر اختلالات وارده بر CNS ممکن است دو تا سه ماه پس از بهبود نیز رخ دهد. سگ‌هایی که به طور کامل بهبود یافته‌اند دیگر حامل ویروس نیستند و آن را گسترش نمی‌دهند (۳).

متأسفانه درمان اختصاصی ضد ویروسی برای بیماری دیستمبر وجود ندارد و درمان‌ها عمدتاً حمایتی‌اند، شامل؛ کنترل اسهال، جبران کم‌آبی با سرم وریدی، تقویت تغذیه با سرم‌های غذایی و ویتامین‌های تزریقی و استفاده از آنتی بیوتیک برای پیشگیری از عفونت ثانویه. در صورت بروز تشنج، داروهایی مانند فنوباربیتال‌ها و پتاسیم برومید تجویز می‌شوند.

موثرترین راه مقابله با دیستمبر پیشگیری از طریق واکسیناسیون است. واکسن‌های کنونی از ویروس زنده ضعیف شده ساخته می‌شوند و ایمنی طولانی مدت ایجاد می‌کنند. واکسیناسیون توله‌ها معمولاً بین ۶ تا ۱۰ هفتگی، پس از کاهش ایمنی ناشی از آغوز، انجام می‌شود. این ویروس هم خانواده ویروسی است که در انسان موجب بیماری سرخک می‌شود (۱۳ و ۱۴).

تشخیص سریع و دقیق دیستمبر از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که علاوه بر کمک به درمان، از گسترش بیماری و تشخیص نادرست جلوگیری می‌کند. روش‌های مختلفی برای شناسایی این بیماری از جمله جداسازی ویروس، ایمونوفلورسانس، RT-PCR و PCR وجود دارد که PCR به عنوان یکی از دقیق‌ترین روش‌ها شناخته می‌شود (۱۵). بر این اساس مطالعه حاضر با هدف مقایسه کارایی کیت ایمونوکروماتوگرافی و روش PCR در تشخیص دیستمبر سگ‌ها انجام شد.

مواد و روش کار

روش کار: در ابتدا حیوانات دارای علائم بالینی مانند ترشحات بینی و چشم یا علائم گوارشی و عصبی شناسایی شدند و کیت تشخیصی الایزا برای آنها گذاشته شد. در مرحله بعد فارغ از نتیجه کیت نمونه های جمع آوری شده از ترشحات مخاطی (چشم، بینی و دهان) توسط سوآپ استریل در درون محلول PBS استریل جهت بررسی مولکولی جمع آوری شدند.

روش نمونه گیری: این مطالعه به صورت مواردی از سگ های مشکوک به دیستمپر که طی اسفند ۱۴۰۰ تا چهار ماه پس از آن به کلینیک مراجعه کردند، انجام شد. جامعه آماری سگ های مشکوک به دیستمپر بود که واکسن دریافت نکرده بودند. توله سگ ها بر اساس سن به دو گروه زیر شش ماه و بالای شش ماه تقسیم شدند و همچنین علائم بالینی آنها به سه دسته عصبی، تنفسی و گوارشی

طبقه بندی گردید.

روش الایزا: در این مطالعه از تست الایزا برای شناسایی آنتی ژن ویروس دیستمپر استفاده شد. اساس کار الایزا بر پایه اتصال اختصاصی بین آنتی ژن و آنتی بادی است که در بستر جامد (پلیت های پلی استیرنی) تثبیت میشوند و استفاده از سیستم آنزیم - سوبسترا حساسیت و اختصاصیت آن افزایش می یابد. در ابتدا سگ های دارای علائم بالینی نظیر ترشحات بینی و چشم یا علائم گوارشی و عصبی شناسایی و با کیت تجاری الایزا مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس، صرف نظر از نتیجه تست، نمونه های خون و سوآب حلقی،

بینی و چشمی و نمونه ادرار جمع آوری شد. نمونه های سوآب در محلول HBSS حاوی استرپتومایسین و پنسیلین قرار گرفتند، فیلتر شده و پس از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه با دور ۱۲۰۰۰ RPM فاز رویی آن جدا گردید. در نهایت، نمونه ها در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری و جهت انجام آزمایش PCR آماده شدند.

ترشحات به لوله هر نمونه سوآپ آغشته به: PCR آزمون انتقال و در شرایط PBS حاوی بافر های آزمایش استریل سرمایی به آزمایشگاه مرجع منتقل گردید. لوله ها در آزمایشگاه تا شروع آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

PCR شامل: استخراج RNA، ساخت cDNA، واکنش زنجیره ای پلیمرز، الکتروفورز در ژل آگاروز.

روش آنالیز آماری: اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری T-TEST و محاسبه میانگین و انحراف معیار مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج جدول ۱ بیانگر آن است که با استفاده از روش رپید تست ۳۴/۳ درصد نمونه ها مثبت و با استفاده از روش PCR 9/42 درصد نمونه ها به ویروس دیستمپر مثبت بودند؛ بنابراین روش PCR دقت بسیار قابل توجهی در تشخیص ویروس دیستمپر دارد.

جدول ۱: مقایسه تعداد و درصد سگ‌های آلوده با ویروس

دیستمبر به دو روش تشخیصی رپید تست و PCR

تعداد نتیجه مثبت با رپید تست (درصد)	۱۲ (۳۴/۳)
تعداد نتیجه منفی با رپید تست (درصد)	۱۶ (۴۵/۷۶)
تعداد نتیجه مثبت با آزمون PCR (درصد)	۱۵ (۴۲/۹)
تعداد نتیجه منفی با آزمون PCR (درصد)	۲۰ (۵۷/۱)

نتایج جدول ۲ بیانگر آن است که با استفاده از روش رپید تست ۵۷/۱۴ درصد نمونه‌ها مثبت واقعی بودند.

جدول ۲: تعداد و درصد سگ‌های مشکوک به آلودگی با

ویروس دیستمبر به روش تشخیصی رپید تست

تعداد نتیجه مشکوک با رپید تست (درصد)	۷ (۲۰)	مثبت واقعی (درصد)	۴ (۵۷/۱۴)
		منفی واقعی (درصد)	۳ (۴۲/۸۶)

نتایج جدول ۳ بیانگر آن است که با استفاده از روش PCR

۵۸/۷ درصد نمونه‌ها مثبت کاذب بودند.

جدول ۳: مقایسه تعداد و درصد مثبت و منفی کاذب سگ

های آلوده به ویروس دیستمبر به دست آمده به روش رپید

تست در قیاس با روش اصلی PCR

تعداد نتیجه مثبت کاذب (درصد)	تعداد نتیجه منفی کاذب (درصد)
۳ (۸/۵۷)	۲ (۵/۷۱)

جدول ۴ بیانگر آن است که با استفاده از روش PCR

مشخص شد که ۲۰/۰۰ درصد از سگ‌های نر و ۲۲/۸۵ درصد

از سگ‌های ماده به ویروس دیستمبر مثبت بودند.

جدول ۴: مقایسه تعداد و درصد سگ‌های آلوده به ویروس

دیستمبر در دو جنس نر و ماده به روش قطعی PCR

تعداد سگ جنس نر (درصد)	۱۹ (۵۴/۲۸)
تعداد سگ جنس ماده (درصد)	۱۶ (۴۵/۷۱)
تعداد نتیجه مثبت جنس نر در آزمون PCR (درصد)	۷ (۲۰/۰۰)
تعداد نتیجه منفی جنس نر در آزمون PCR (درصد)	۱۱ (۳۱/۴۲)
تعداد نتیجه مثبت جنس ماده در آزمون PCR (درصد)	۸ (۲۲/۸۵)
تعداد نتیجه منفی جنس ماده در آزمون PCR (درصد)	۹ (۲۵/۷۱)

جدول ۵ بیانگر آن است که با استفاده از روش رپید تست

مشخص شد که ۲۵/۷۱ درصد از سگ‌های نر و ۷/۸۹ درصد

از سگ‌های ماده به ویروس دیستمبر مثبت بودند. همچنین

درصد نتیجه مشکوک جنس ماده با رپید تست ۱۴/۲۸

درصد و درصد نتیجه مشکوک جنس نر با رپید تست ۵/۷۱

درصد بود.

جدول ۵: مقایسه تعداد و درصد سگ‌های آلوده به ویروس

دیستمبر در دو جنس نر و ماده به روش رپید تست

تعداد نتیجه مثبت جنس نر با رپید تست (درصد)	۹ (۲۵/۷۱)
تعداد نتیجه منفی جنس نر با رپید تست (درصد)	۷ (۲۰/۰۰)
تعداد نتیجه مثبت جنس ماده با رپید تست (درصد)	۳ (۷/۸۹)
تعداد نتیجه منفی جنس ماده با رپید تست (درصد)	۹ (۲۵/۷۱)
تعداد نتیجه مشکوک جنس ماده با رپید تست (درصد)	۵ (۱۴/۲۸)
تعداد نتیجه مشکوک جنس نر با رپید تست (درصد)	۲ (۵/۷۱)

۲۰ (۵۷/۱۴)	تعداد کل سگ‌هایی با اسهال و استفراغ هم‌زمان (درصد)
۱۵ (۴۲/۸۶)	تعداد کل سگ‌هایی بدون اسهال و استفراغ هم‌زمان (درصد)
۳ (۸/۵۷)	تعداد نتیجه مثبت با آزمون PCR در سگ‌هایی با اسهال و استفراغ (درصد)
۱۲ (۳۴/۲۹)	تعداد نتیجه منفی با آزمون PCR در سگ‌هایی با اسهال و استفراغ (درصد)

جدول ۶ بیانگر آن است که ۵۷/۱۴ درصد از سگ‌های بومی و ۴۲/۸۶ درصد از سگ‌های نژاد دار به ویروس دیستمپر آلوده بودند. با استفاده از روش قطعی PCR، ۳۱/۴۲ درصد از سگ‌های بومی و ۱۱/۴۳ درصد سگ‌های نژاد به ویروس دیستمپر آلوده بودند.

جدول ۶: مقایسه اثر نژاد روی تعداد و درصد سگ‌های آلوده به ویروس دیستمپر به روش قطعی PCR.

۲۰ (۵۷/۱۴)	تعداد کل سگ‌های نژاد بومی (درصد)
۱۵ (۴۲/۸۶)	تعداد کل سگ‌های نژاد دار (درصد)
۱۱ (۳۱/۴۲)	تعداد نتیجه مثبت نژاد بومی با آزمون PCR (درصد)
۱۰ (۳۵/۰۰)	تعداد نتیجه منفی نژاد بومی با آزمون PCR (درصد)
۴ (۱۱/۴۳)	تعداد نتیجه مثبت سگ‌های نژاد دار با آزمون PCR (درصد)
۱۰ (۳۵/۰۰)	تعداد نتیجه منفی سگ‌های نژاد دار با آزمون PCR (درصد)

ویروس دیستمپر سگ‌ها ویروسی از جنس موربیلی ویروس و خانواده پارامیکسوویریده با ژنوم RNA تک‌رشته‌ای است (۱۹). این ویروس به صورت آندمیک در سراسر جهان وجود دارد و عمدتاً از طریق قطرات تنفسی حیوانات آلوده صورت می‌گیرد (۲۰). شدت تظاهرات بالینی بیماری به عواملی نظیر سویه ویروس، شرایط محیطی، سن و وضعیت ایمنی حیوان بستگی داشته و با نرخ مرگ و میر حدوداً ۵۰ درصد همراه است (۲۱).

تشخیص بیماری بر اساس علائم بالینی و عدم سابقه واکسیناسیون انجام می‌گیرد اما به دلیل غیر اختصاصی بودن علائم اولیه، نیاز به روش‌های تشخیصی سریع و دقیق وجود دارد (۲۲). مطالعات نشان می‌دهد که روش PCR از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است؛ به طوری که در مطالعه حاضر، ۳۴/۳ درصد موارد با رپید تست و ۴۲/۹ درصد با PCR مثبت تشخیص داده شدند. بنابراین، استفاده از PCR نقش موثری در شناسایی دقیق و کنترل بیماری دیستمپر دارد (۲۳، ۲۴ و ۲۵).

جدول ۷ بیانگر آن است که ۵۷/۱۴ درصد از کل سگ‌دارای اسهال و استفراغ هم‌زمان بودند. همچنین نتیجه مثبت با آزمون PCR در سگ‌هایی با اسهال و استفراغ ۸/۵۷ درصد بود.

جدول ۷: مقایسه تعداد و درصد سگ‌های آلوده به ویروس دیستمپر با نشانه‌های درمانگاهی (اسهال و استفراغ) به روش قطعی PCR

مشکوک ارائه شده اند . در مطالعه ای توسط محمد و همکاران (۲۰۲۲) در عراق، شیوع دیستمبر با روش الایزا و PCR بررسی شد ؛ نتایج نشان داد که به ترتیب ۶/۹۶٪ و ۱۹/۶۲٪ از سگ‌ها به صورت حاد و مزمن سرم مثبت بودند. همچنین میزان شیوع با روش الایزا و RT-PCR برابر با ۸/۸۶٪ گزارش شد .

حساسیت و ویژگی کیت ELISA IgM نسبت به RT-PCR به ترتیب ۷۵٪ و ۹۸/۶۳٪ بود و مقادیر پیش بینی مثبت و منفی آن نیز به ترتیب ۸۱/۸۲٪ و ۹۷/۹۶٪ برآورد شد (۱۹).

آن و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه ای با مقایسه روش ایمونوکروماتوگرافی و روش PCR برای تشخیص دیستمبر در سگ‌ها نشان دادند ؛ که هریک از این روش‌ها مزایای خاص خود را دارند ؛ اگرچه دقت PCR بالاتر است ، اما ایمونوکروماتوگرافی به دلیل سادگی و عدم نیاز به تجهیزات تخصصی ، برای استفاده صاحبان سگ مناسبتر است . همچنین ، تشخیص زودهنگام از طریق PCR میتواند با تسهیل درمان و قرنطینه سریع در کاهش عوارض و مرگومیر بیماری موثر باشد.

در مطالعه ای دیگر، دونگ و همکاران (۲۰۱۵) در چین با به کار گیری روش RT-PCR داپلکس برای تمایز سویه های وحشی و واکسن دیستمبر ، ۶۷ نمونه مشکوک را بررسی کردند که نتایج حاکی از آلودگی ۵۰ درصدی (۳۳ نمونه) به ویروس دیستمبر بود (۱۵).

مطالعات محدودی تاکنون به بررسی شیوع ویروس دیستمبر در ایران پرداخته‌اند. گنج خانلو و همکاران (۱۳۹۶) در مطالعه ای روی ۱۴۸ قلاده سگ ولگرد در تبریز شیوع ۴/۰۵ درصد را گزارش کردند (۱۷).

نقیبی و همکاران (۱۳۹۱) نیز در بررسی سگ های خانگی ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی اهواز ، میزان شیوع را ۲/۸۲ درصد اعلام نمودند و فرم های تنفسی (۳۲/۶) درصد و گوارش (۲۹/۵) درصد را شایع تر دانستند (۱۶).

همچنین مصلی نژاد و همکاران (۱۳۸۸) با استفاده از روش ایمونوکروماتوگرافی ، شیوع ۸/۹۷ درصد را در سگ های اسهالی اهواز گزارش کردند که ۷ مورد از ۷۸ کیس مورد مطالعه نتیجه تستشان مثبت بود.

توکلی زانیانی و همکاران (۲۰۲۱) نیز در مطالعه ای ژنومی و ایمونولوژیک ، ۳۷ نمونه مثبت دیستمبر را با روش RT-PCR در بین سگ های مشکوک شناسایی کردند.

مطالعات متعددی در سطح جهان به بررسی شیوع ویروس دیستمبر سگ ها پرداخته اند . میزان شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های دیستمبر در کشور های مختلف متفاوت گزارش شده است به طور مثال ؛ در نیجریه ۷/۵٪ ، درهند بین ۹ تا ۷۲٪ ، در ترکیه ۹/۰۳٪ ، در برزیل ۱۵٪ (د آلمیدا و همکاران، ۲۰۱۶)، در ایران ۱۷/۵۲٪ و در اسپانیا ۱۸/۷٪ گزارش شده است (۲۶،۲۷،۲۸ و ۲۹).

بالین‌حال، اطلاعات دقیق درباره تشخیص و شیوع این بیماری محدود بوده و اغلب براساس علائم بالینی سگ های

نتایج این مطالعه نشان داد که روش RT-PCR دو رشته‌ای دارای ویژگی و حساسیت بالایی است و قادر به شناسایی و تمایز مؤثر بین سویه های واکسن و نوع وحشی ویروس دیستمپر می باشد. این امر کاربرد بالینی و اپیدمیولوژیکی این روش را تایید می کند (۳۰). سایر مطالعات نیز بر دقت بالای روش PCR در تشخیص دیستمپر تأکید داشته اند؛ به گونه‌ای که میزان آلودگی به ویروس دیستمپر با استفاده از PCR در ایران ۱۵٪ (۲)، در هند ۲۱٪ (۳۱)، در چین ۲۴/۸۸٪ (۳۲)، در مجارستان ۳۰/۶۶٪ (دمیتر و همکاران، ۲۰۰۷) و در آرژانتین ۷۳/۷۴٪ (۳۳) گزارش شده است. علاوه بر این، مطالعات متعددی حساسیت اختصاصیت بالای RT-PCR را در شناسایی ویروس در نمونه‌های مختلف بالینی مانند سرم، ادرار و سواب ملتحمه و همچنین در مراحل تحت حاد و مزمن بیماری تأیید کرده‌اند. این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر که دقت بالای PCR را نشان داد، همخوانی دارد.

نتایج مطالعه حال حاضر نشان داد که میزان آلودگی به ویروس دیستمپر براساس جنسیت سگ‌ها متفاوت بوده است؛ به طوری که با استفاده از رپید تست، ۲۵/۷۱ درصد از سگ‌های نر و ۷/۸۹ درصد از سگ‌های ماده مثبت بودند، در حالی که با روش PCR این میزان به ترتیب ۲۰٪ در نرها و ۲۲/۵۸٪ در ماده ها گزارش شد (۳۴، ۳۱، ۳۵).

مطالعات پیشین نیز نتایج مشابهی ارائه داده اند. گنج خانلو و همکاران (۱۳۹۶) نیز طبق مطالعات خود گزارش نمودند

که از لحاظ جنس تفاوت معنی داری در شیوع و بروز بیماری مشخص نگردید (۱۷). نقیبی و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی اثر جنس بر شیوع بیماری دیستمپر سگ‌ها گزارش نمودند که موارد بیماری در سگ‌های نر به صورت غیر معنی داری بیشتر از سگ‌های ماده بود و شانس ابتلای سگ‌های نر ۱۰۴ برابر سگ‌های ماده بود (۱۶). در مطالعه ای در کشور هندوستان شیوع در جنس نر و ماده به ترتیب ۶۰ و ۴۰ درصد گزارش شد (۳۶). در ایالات متحده آمریکا شیوع در جنس نر و ماده به ترتیب ۴۵ و ۵۵ درصد گزارش گردیده است (۳۷). مطالعات انجام شده روی سایر حیوانات نیز نشان داد، اختلاف معنی داری بین دو جنس از نظر شیوع وجود ندارد (۳۸) که با یافته های بدست آمده در مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که آلودگی در سگ‌های بومی (که اغلب به صورت ولگرد زندگی می کنند) بیشتر از سگ‌های نژاد دار (سگ‌هایی که اغلب دارای صاحب می باشند و در محیط محصور زندگی می کنند) بود؛ به نحوی که ۵۷/۱۴ درصد از سگ‌های بومی و ۴۲/۸۶ درصد از سگ‌های نژاد دار به ویروس دیستمپر آلوده بودند. با استفاده از روش قطعی PCR، ۳۱/۴۲ درصد از سگ‌های بومی و ۱۱/۴۳ درصد سگ‌های نژاد به ویروس دیستمپر آلوده بودند. در یک مطالعه که بر روی سگ‌های پارک وحش تانزانیا انجام گرفت، وجود سگ‌های اهلی در یک جمعیت با تراکم بالا در ناحیه غرب آن منطقه را منشاء بیماری سگ‌ها قلمداد نمودند. در حالی که در قسمت جنوب و شرق پارک مزبور که جمعیت سگ‌ها از تراکم پایین

نتیجه‌گیری نهایی:

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر مشخص نمود که نوع روش اندازه‌گیری تأثیر قابل‌توجهی بر شناسایی و تعیین میزان شیوع بیماری دارد به‌نحوی که مشخص شد که با استفاده از روش رپید تست ۳۴/۳ درصد نمونه‌ها مثبت و با استفاده از روش PCR 9/42 درصد نمونه‌ها به ویروس دیستمپر مثبت بودند؛ بنابراین روش PCR دقت بسیار قابل‌توجهی در تشخیص ویروس دیستمپر دارد. باتوجه‌به شیوع قابل‌توجه بیماری دیستمپر در سگ‌ها، انجام واکسیناسیون و رعایت موازین بهداشتی توصیه می‌شود.

برخوردار بوده، هیچ گونه توله سگ مثبت از نظر تیتراژ آنتی بادی یافت نشد (۳۹). در بررسی آویزه و صیفی (۱۳۸۴) که نمونه‌های سرمی به طور تصادفی از ۶ روستای اطراف شهر اهواز جمع‌آوری شده بود، شیوع آنتی بادی علیه ویروس دیستمپر، اختلاف معنی‌داری در بین مناطق مختلف نداشته است (۴۰). به طور کلی در مناطقی می‌بایست انتظار شیوع بیشتری داشت که سگ‌ها امکان تماس با حیوانات وحشی و یا مبتلا را داشته باشند و چنانچه که در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد؛ آلودگی در سگ‌های بدون نژاد و ولگرد که دارای تماس بیشتری با محیط اطراف و حیوانات ولگرد دارند، بیشتر از سگ‌های نژاد دار و خانگی بود.

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر حاکی از آن بود که که ۵۷/۱۴ درصد از کل سگ دارای اسهال و استفراغ همزمان بودند. همچنین نتیجه مثبت با آزمون PCR در سگ‌هایی با اسهال و استفراغ ۸/۵۷ درصد بود. گنج‌خانلو و همکاران (۱۳۹۶) با بررسی علائم سگ‌های مبتلا به دیستمپر بیان نمودند که سگ‌هایی که دچار اسهال شده بودند، به دو گروه اسهال خونی و اسهال معمولی تقسیم‌بندی شدند و مشاهده شد که ۴ مورد (۶۶/۶۶ درصد) از موارد مثبت دچار اسهال خونی بوده‌اند و ۲ مورد (۳۴/۳۳ درصد) دچار اسهال غیر خونی بوده‌اند (۳۹). مصلی نژاد و همکاران (۱۳۸۸) در مطالعه‌ای با بررسی میزان شیوع دیستمپر در سگ‌های اسهالی شهرستان اهواز بیان نمودند که عفونت به طور قابل‌توجهی در سگ‌های دارای اسهال هموراژیک بیشتر بود ۷/۲۰ درصد؛ ۶ مورد از ۲۹ مورد (۱۸).

1. Isfahani MS, Rostami A, Bahonar A, Barin A, Memarian I. (2017). Serologic survey for canine distemper virus in free-ranging wild canids in the northeast of Iran. *Revue De Medecine Veterinaire*. 168(10-12):247-51.
2. Dong X.Y, Li W.H, Zhu J.L. (2015). Detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus by a duplex reverse transcription, *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, 16 (2): 172-175.
3. Lavan R & Knesl O. (2015). Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters. *Journal of Small Animal Practice*, 56: 572-576.
4. Schulz BS, Kurz S, Weber K, Balzer HJ, Hartmann K. (2014). Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Veterinary Journal*, 201: 365-369.
5. Namroudi S, Rostami A, Barin A, Ardebili KM. (2013). Antibody monitoring to canine distemper virus in unvaccinated rural dogs in the southern coastal region of Caspian sea. *Journal of Veterinary Research*. 68(3):209-15.
6. Dahiya S. S., Saini M., Kumar P., Gupta P. K. (2012). Immunogenicity of a DNA-Launched Replicon-Based Canine Parvovirus DNA Vaccine Expressing VP2 Antigen in Dogs. *Res. Vet Sci*. 93 (2), 1089–1097.
7. Beineke A., Puff C., Seehusen F. and Baumgartner W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127: 1-18.
8. Mochizuki M, Yachi A, Ohshima T, Ohuchi A, Ishida T. (2008). Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(6): 563-569.
9. Avizeh R, Shapouri MR, Akhlaghi N. (2007). Antibody titers against canine distemper virus in unvaccinated rural dogs from Ahvaz, Iran. *Pak J Biol Sci*. 1;10(21):3970-2.
10. Greene C.E. and Appel M.J. (2006). Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. 3th ed. Saunders Elsevier Inc, pp: 25-41.
11. Ezeibe M.C. (2005). Canine distemper in local dogs in Nsukka, Nigeria. *Veterinary Record*, 156: 840-842.
12. Vandeveld M & Zurbriggen A. (2005). Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*. 109(1): 56-68.
13. Cattet M.R., Duignan P.J., House C.A. and Aubin D.J. (2004). Antibodies to canine distemper and phocine distemper viruses in polar bears from the Canadian arctic. *Journal of Wildlife Disease*, 40: 338-342.
14. *Journal of Wildlife Disease*, 40: 338-342.

15. Buchholz U. J., Finke S., Conzelmann K. K. (1999). Generation of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) From cDNA: BRSV NS2 is Not Essential for Virus Replication in Tissue Culture, and the Human RSV Leader Region Acts as a Functional BRSV Genome Promoter. *J. Virol.* 73 (1), 251–259. doi: 10.1128/JVI.73.1.251-259.1999
۱۶. زیاو ی، ون هو ل، جون لینگ ژ. (۱۳۹۴). شناسایی و تفریق سویه‌های وحشی و واکسن ویروس دیستمپر سگ‌سانان، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، ۱۶ (۵۱): ۱۷۲–۱۷۵.
۱۷. گنج خانلو ا، آذری کی ی، طایفه شکر س، وقاری عتیق، ا. (۱۳۹۶). بررسی میزان شیوع بیماری دیستمپر در بین ۱۴۸ قلاده سگ ولگرد شهرستان تبریز، یازدهمین کنگره دانشجویان دامپزشکی ایران، بابل، ۱–۱.
۱۸. مصلی‌نژاد ب، آویزه ر، قربان‌پور نجف‌آبادی م، پورمهدی م. (۱۳۸۸). بررسی میزان شیوع دیستمپر در سگ‌های اسهالی شهرستان اهواز، نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران، ۳ (۲): ۶۳.
19. Gou W., Evermann J.F., Foreyt W.J., Knowlton F.F. and Windberg L.A. (1986). Distemper virus in coyotes: a serological survey. *American Journal of Veterinary Research*, 189: 1099-1100.
20. Halecker S, Bock S, Beer M, Hoffmann B. A New Molecular Detection System for Canine Distemper Virus Based on a Double-Check Strategy. *Viruses*. 2021 Aug 18;13(8):1632.
21. Headley SA, Alfieri AA, Fritzen JT, Garcia JL, Weissenböck H, da Silva AP, Bodnar L, Okano W, Alfieri AF. (2013). Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25: 129-135.
22. Headley S, Bodnar L, Silva A, Alfieri A, Gomes L, Okano W, et al. Canine distemper virus with concomitant infections due to canine herpesvirus-1, canine parvovirus, and canine adenovirus in puppies from Southern Brazil. *J Microbiol Pathol*. 2115;14115.
23. Headley SA, Bodnar L, Silva AP, Alfieri AF, Gomes LA, Okano W, Alfieri AA. (2015). Canine Distemper Virus with Concomitant Infections Due to Canine Herpesvirus-1, Canine Parvovirus, and Canine Adenovirus in Puppies from Southern Brazil. *Jacobs Journal of Microbiology and Pathology*, 1(2): 015.
24. Kennedy S, Kuiken T, Jepson PD, Deaville R, Forsyth M, Barrett T, et al. Mass die-Off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging infectious diseases*. 2000; 6(6):637.
25. Li C, Guo D, Wu R, Kong F, Zhai J, Yuan D, Sun D. Molecular surveillance of canine distemper virus in diarrhoeic puppies in northeast China from May 2014 to April 2015. *J. Vet. Med. Sci*. 2018; 17:5–19.
26. Liu Y, Liu C, Ding H, Cao Y, Sun Z, Wu H, Wang L, He W, Huang B, Xi X, Tian K. A highly virulent canine distemper virus strain isolated from vaccinated mink in China. *Virus Genes*. 2021 Jun;57(3):266-275.

27. Mohammad HA, Ajaj EA, Gharban HAJ. The first study on confirmation and risk factors of acute and chronic canine distemper in stray dogs in Wasit Province, Iraq, using enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet World*. 2022 Apr;15(4):968-974.
28. Nezaratizade S, nasiri N, nasiri N, momtaz H. A CASE REPORT OF HUMAN DISTEMPER VIRUS AND SCIENTIFIC RESEARCH STUDY ABOUT IT. *Studies in Medical Sciences* 2020; 31 (9) :643-649
29. Oleaga Á, Vázquez CB, Royo LJ, Barral TD, Bonnaire D, Armenteros JÁ, Rabanal B, Gortázar C, Balseiro A. Canine distemper virus in wildlife in south-western Europe. *Transbound Emerg Dis*. 2022 Jul;69(4):e473-e485.
30. Plattet P., Zweifel C., Wiederkehr C., Belloy L., Cherpillod P., Zurbriggen A., et al.. (2004). Recovery of a Persistent Canine Distemper Virus Expressing the Enhanced Green Fluorescent Protein From Cloned cDNA. *Virus Res*. 101 (2), 147–153.
31. Sarchahi AA, Arbabi M, Mohebalian H. Detection of canine distemper virus in cerebrospinal fluid, whole blood and mucosal specimens of dogs with distemper using RT-PCR and immunochromatographic assays. *Vet Med Sci*. 2022 Jul;8(4):1390-1399.
32. Shi N, Zhang L, Yu X, Zhu X, Zhang S, Zhang D, Duan M. Insight Into an Outbreak of Canine Distemper Virus Infection in Masked Palm Civets in China. *Front Vet Sci*. 2021 Nov 3;8:728238.
33. Sobrino R, Arnal M.C, Luco D.F, Gortázar C. Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from Spain. *Vet. Microbiol*. 2008;126(1-3):251–256.
34. Teixeira Ribeiro AI, da Cruz Burema M, de Souza Borges AP, de Melo Bruno VC, Brandini Néspoli PE. (2020). Pyogranulomatous pleuropneumonia caused by *Nocardia asiatica* in a dog coinfecting with canine morbillivirus (canine distemper virus). *Veterinary medicine and science*. 6(1):25-31.
35. Tipold A, Vandeveld M, Wittek R, Moore P, Summerfield A, Zurbriggen A. Partial protection and intrathecal invasion of CD2+ T cells in acute canine distemper virus infection. *Veterinary microbiology*. 2111;23(3):123-213.
36. Tozato C.D.C, Zadra V.F, Basso C.R, Araújo J.P. Canine distemper virus detection by different methods of One-Step RT-qPCR. *Ciê. Rural*. 2016;46(9):1601–1606.
37. Vila Nova B., Cunha E., Sepúlveda N., Oliveira M., São Braz B., Tavares L., et al.. (2018). Evaluation of the Humoral Immune Response Induced by Vaccination for Canine Distemper and Parvovirus: A Pilot Study. *BMC Vet Res*. 14 (1), 348.
38. Wang J, Wang J, Li R, Liu L, Yuan W. Rapid and sensitive detection of canine distemper virus by real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification. *BMC Vet. Res*. 2017;13(1):1–7.

39. Wang R, Wang X, Zhai J, Zhang P, Irwin DM, Shen X, Chen W, Shen Y. A new canine distemper virus lineage identified from red pandas in China. *Transbound Emerg Dis*. 2022 Jul;69(4):e944-e952.
40. Wu Z.M, Yu Z.J, Cui Z.Q, Peng L.Y, Li H.R, Zhang C.L, Fu B.D. In vitro antiviral efficacy of caffeic acid against canine distemper virus. *Microb. Pathog*. 2017; 110:240–244.

Comparison of Immunochromatography Kit with PCR in the Diagnosis of Distemper Disease in Dogs

Morteza Razaghimanesh ^{1*}, Reza Naghihanajafabadi ², Yasaman Norzade ³, Ayda Sharifiyan ⁴,
Zahra Sadeghiyan⁴

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Khuzestan, Iran

2. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Yasuj University, yasuj, Iran.

3. Doctor of Veterinary Medicine (DVM) Graduate, Islamic Azad University Shushtar Branch, Iran.

4. Doctor of Veterinary Medicine Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shushtar Azad University, Shushtar Iran

*Corresponding author: Morteza_vet@yahoo.com

Abstract

Canine distemper virus (CDV) is a highly contagious viral disease affecting multiple organ systems, primarily transmitted through the respiratory tract.

To compare the diagnostic accuracy of immunochromatographic (rapid) kits with polymerase chain reaction (PCR) for detecting CDV in dogs, based on cases referred to small animal clinics in Karaj County, Iran.

Dogs exhibiting clinical signs such as nasal/ocular discharge, gastrointestinal symptoms, or neurological manifestations were initially identified. Diagnostic ELISA kits were administered, followed by sterile swab collection of mucosal secretions.

into phosphate-buffered saline (PBS) solution for molecular analysis, irrespective of ELISA results. Specimens were evaluated using rapid tests and PCR, with subsequent statistical analysis of the data.

The study revealed significant diagnostic variation between methods (rapid test: 34.3% positive; PCR: 42.9% positive) and gender-based differences in detection rates (rapid test: males 71.25%, females 89.7%; PCR: males 20%, females 85.22%). Native dogs exhibited higher infection rates (rapid test: 57.14%; PCR: 31.42%) compared to pedigree dogs (rapid test: 42.86%; PCR: 11.43%). Concurrent diarrhea and vomiting were observed in 57.14% of infected dogs, with PCR positivity in 57.8% of these cases.

The substantial prevalence of CDV underscores the critical need for routine vaccination and stringent hygiene protocols to mitigate transmission.

Keywords: Canine Distemper, Dog, Immunochromatography, PCR