

ارزیابی وضعیت ابتلاء به هیپاتیت E در گربه‌های خانگی دارای علائم اسهال و استفراغ، بر اساس جستجوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد ویروس هیپاتیت E به روش الایزای غیرمستقیم و سنجش برخی فراسنجه‌های سرم خون

الناز جهان‌بخشی^۱، مهرداد نشاط قراملکی^{۲*}، یونس انزایی^۳

۱-دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: Neshatpetvet@yahoo.com

چکیده

حیوانات خانگی اغلب در معرض ویروس ژئونوز هیپاتیت E قرار می‌گیرند و لذا به‌طور بالقوه در دامپزشکان و کارکنان مراکز پرورش و نگهداری حیوانات خانگی، می‌زان آنتی‌بادی‌های ضد ویروس مذکور بالاتر می‌باشد. همچنین اگرچه علائم بالینی بیماری هیپاتیت E در گربه‌ها بخوبی توصیف نشده، اما شواهد حضور آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هیپاتیت E در سرم گربه‌های دارای علائم اسهال و استفراغ تا حدود زیادی نشان داده شده‌است. لذا هدف از انجام تحقیق حاضر، تشخیص ابتلاء به ویروس هیپاتیت E در گربه‌های خانگی دارای علائم اسهال و استفراغ براساس جستجوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی به روش الایزای غیرمستقیم و سنجش برخی فراسنجه‌های خونی بود. بدین منظور تعداد ۱۰۰ قلاده گربه خانگی که دارای علائم اسهال و استفراغ بودند و همچنین تعداد ۱۰۰ قلاده گربه خانگی دی‌گر که به لحاظ علائم گوارشی به ظاهر سالم بوده و به دلایلی غریب از بی‌ماری‌های گوارشی به بی‌مارستان تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز ارجاع داده شده بودند، به روش تصادفی ساده انتخاب شدند. از همه گربه‌ها خون‌گیری شد و ضمن انجام آزمایشات خون-شناسی، پس از تهیه سرم مربوطه و بررسی برخی فاکتورهای بیوشیمیایی، از روش الایزای غیرمستقیم و کیت اختصاصی مربوطه جهت تشخیص آزمایشگاهی هیپاتیت E استفاده گردید. براساس یافته‌ها تنها یک نمونه (۰/۵ درصد موارد) در محدوده مثبت سرمی بود (مربوط به نمونه خون یک قلاده گربه نر ۳ ساله خانگی)، همچنین مقادیر غلظت متوسط هموگلوبین، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌های خون و نیز مقادیر اوره، تری‌گل‌سیرید، پروتئین‌کل، فسفر و آنزیم کراتین فسفوکیناز سرم مربوطه، دستخوش تغییری رات افزایشی شده بودند. شیوع سرمی ویروس هیپاتیت E در گربه‌های خانگی شهر تبریز بسیار پائین ثبت گردید. کلیدواژه‌ها: گربه خانگی، اسهال، استفراغ، هیپاتیت E، الایزای غیرمستقیم.

مقدمه

ویروس هپاتیت E (Hepatitis E Virus; HEV) بر اساس نهمین گزارش ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) در سال ۲۰۲۰، عضوی از جنس *Hepevirus* از خانواده *Hepeviridae* بوده که دارای ژنوم ssRNA با سنس مثبت و فاقد پوشینه می باشد (Yoo et al., 2001). در اکثر گزارشات، غالباً ۴ ژنوتیپ برای ویروس هپاتیت E توصیف شده که شامل ژنوتیپ های برمه، مکزیک، ایالات متحده و چین می باشند. البته یک نوع جدید با نام ژنوتیپ ۵ هم در پرندگان ایتالیا مشاهده شده (Izopet et al., 2019) و اخیراً هم ژنوتیپ های ۶ و ۷ از یونان گزارش شده است (Kabrane-Lazizi et al., 1999). ژنوتیپ های ۱ و ۲ فقط انسان ها را آلوده می کنند اما ژنوتیپ های ۳ و ۴، انسان، خوک و بسیاری از دی گر گونه های جانوری را هم آلوده می کنند. در واقع ژنوتیپ های ویروس مذکور، به وضوح و با توجه به گونه می زبان متفاوت هستند (Okamoto et al., 2004; Purcell et al., 2011). البته ژنوتیپ های ویروس مذکور ممکن است همگی در یک منطقه، هم در انسان و هم در حیوان وجود داشته باشند (Li et al., 2009).

ویروس هپاتیت E از مدفوع افراد و حیوانات آلوده دفع و عمدتاً در اثر نوشیدن آب آلوده انتقال پیدا می کند. این عفونت معمولاً خود محدود شونده بوده و در طی ۲ تا ۶ هفته برطرف می شود. اما گاهی یک بی ماری جدید که تحت عنوان هپاتیت برقی آسا شناخته می شود (نارسایی حاد کبدی) بروز پیدا می کند و بخشی از مبتلایان به آن ممکن است جان خود را از دست بدهند (Cooper et al., 2005). از دیدگاه بهداشت عمومی هم گزارش شده که اپیدمی های هپاتیت E به طور اولیه با منشأ مصرف آب آلوده و در مناطقی اتفاق افتاده که منابع آب آشامیدنی به واسطه انسان آلوده شده اند، هرچند در سال های اخیر به طور فزاینده ای شواهدی به دست آمده که نشان می دهند، تعداد زیادی از گونه های حیوانی با ویروس هایی که از نظر آنتی ژنی با ویروس هپاتیت E مشابهت نزدیکی دارند، آلوده شده اند (Goens and Perdue, 2004). مطالعات مختلف برای یافتن اینکه آیا سگ ها و گربه های خانگی نقش مهمی در انتقال ویروس هپاتیت E دارند، انجام شده و نتایج، وجود ویروس هپاتیت E در گربه را نشان داده است (Mochizuki et al., 2006). به طور کلی، مطالعات نشان می دهد که حیوانات خانگی اغلب در معرض ویروس هپاتیت E قرار می گیرند و بنابراین بالقوه برای انسان های در تماس نزدیک با این حیوانات عفونی هستند. براین اساس، در مقایسه با جمعیت عمومی، در دامپزشکان و کارکنان مراکز پرورش و نگهداری حیوانات خانگی، میزان آنتی بادی های ضد ویروس هپاتیت E به طور قابل توجهی بالاتر است (Zeng et al., 2017). یکی از مهم ترین گونه های حیوانی مستعد ابتلا که ارتباط نزدیکی نیز با انسان داشته و خطر ترویج و توسعه ویروس هپاتیت E به واسطه آن وجود دارد، گربه است (Stiles, 2014). مشخص شده که گربه های خانگی که غذای مشترکی مانند باقی مانده های آشپزخانه را با جمعیت عمومی مردم شریک می شوند، در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به ویروس هپاتیت E هستند. آشغال و بقایای آشپزخانه ممکن است یک خطر بالقوه برای انتقال ویروس هپاتیت E از انسان به حیوانات خانگی باشد (Liang et al., 2014). مطالعات اپیدمیولوژیکی برای یافتن اینکه آیا گربه های خانگی نقش مهمی در انتقال ویروس هپاتیت E بازی می کنند، انجام شده و نتایج وجود نمونه سرمی مثبت آنتی بادی علیه ویروس هپاتیت E در گربه ها را نشان داده است (Mochizuki et al., 2006). شیوع سرمی آنتی بادی های ضد HEV در گربه ها و سگ های قاره های مختلف، بین ۰/۹ تا ۵۶/۶ درصد گزارش شده است (Okamoto et al., 2004; Mochizuki et al., 2006).

2006; Peralta *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2014; Dähnert *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; Capozza *et al.*, 2021). در سال ۲۰۰۳، مطالعه‌ای در ژاپن نشان داد که یک مورد نادر هپاتیت E در یک مرد ۴۷ ساله، احتمالاً به دلیل تماس با گربه خانگی آلوده به HEV بوده است. این مطالعه، گربه‌ها را به عنوان یک منبع بالقوه انتقال HEV به انسان‌ها معرفی کرد (Kuno *et al.*, 2003). با توجه به تمایل بالای نگهداری حیوانات خانگی به‌ویژه گربه در جامعه امروز از یک سو و وجود شواهدی مبنی بر ابتلای این حیوانات به هپاتیت E و همچنین اهمیت علائم گوارشی در آن‌ها و نقش گربه‌ها در انتقال بیماری، لذا در مطالعه حاضر، هدف اصلی، بررسی شیوع سرمی هپاتیت E در گربه‌های خانگی مبتلا به اسهال و استفراغ در شهر تبریز در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر که به صورت مشاهده‌ای- توصیفی انجام شد، کلیه اصول و ملاحظات اخلاقی در حین انجام کار و بعد از آن (در صورت نیاز به دفن) رعایت شد. همچنین همه مراحل کار بر روی حیوانات مورد نظر، بر اساس مصوبه کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی به تاریخ ۱۴۰۲/۰۷/۰۴ و با کد IR.IAU.TABRIZ.REC.1402.297 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز انجام گرفت.

جهت انجام پژوهش حاضر تعداد ۱۰۰ قلاده گربه خانگی مبتلا به اسهال و استفراغ و نیز تعداد ۱۰۰ قلاده گربه خانگی دیگری که به ظاهر سالم از نظر علائم گوارشی اسهال و استفراغ بودند، در یک بازه ۶ ماهه (از آبان ۱۴۰۲ تا اردیبهشت ۱۴۰۳) از میان موارد ارجاع شده به بیمارستان تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز به روش تصادفی ساده انتخاب شد. در ادامه جهت انجام آزمایش‌های تشخیصی مورد نظر، پس از مهار هر حیوان و اخذ ۲ میلی‌لیتر خون به‌طور جداگانه در شرایط کاملاً آسپتیک از ورید سافن با استفاده از لوله‌های ونوجکت Clot Activator حاوی ژل و فاقد ماده ضدانعقاد، ساخت شرکت پارس پیوند (تهران- ایران)، جهت جداسازی سرم نمونه‌های خون طی زنجیره سرد، به آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی ارسال شد. نمونه‌ها مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط می‌ماند و سپس با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ می‌شدند (شرکت پارس آزمون، تهران- ایران). در ادامه سرم‌های جدا شده به می‌کروتیوب‌های جدید منتقل گردیده و پس از شماره‌گذاری و ثبت توضیحات مربوطه، تحت دمای فریزر آزمایشگاهی (منفی ۲۰ درجه سلسیوس)، تا زمان تکمیل تعداد نمونه‌ها و انجام آزمایشات سرمی مورد نظر، در شرایط انجماد نگهداری می‌شدند. لازم به ذکر است که قبل از خون‌گیری، ضمن ثبت پارامترهای اپی‌دمی‌ولوژی‌ک مورد نظر، شامل سن، جنسیت، نژاد، شرایط تغذیه و ساعت‌های خارج از خانه، هر گربه از نظر جسمی نیز معالینه می‌گردید و همچنین وجود یا عدم وجود علائم گوارشی، به‌ویژه اسهال و استفراغ ثبت می‌شد. علت انتخاب اسهال و استفراغ به عنوان علائم اصلی مورد نظر در تحقیق حاضر نیز، مربوط به وجود این نشانه در میان نشانه‌های عمده ابتلاء به هپاتیت E و تفاوت براساس آن، در میان گروه‌های مبتلا و سالم در مطالعات گذشته بود (Lyyo *et al.*, 2019).

در مطالعه حاضر، تشخیص سرولوژیکی هپاتیت E در نمونه‌های سرم گربه‌های تحقیق، با استفاده از روش الایزای غیرمستقیم (indirect ELISA) انجام گرفت. بدین منظور از کیت الایزای HEV AB Ultra ساخت شرکت Dia.Pro

کشور ایتالیا استفاده شد. براساس بروشور شرکت سازنده، کیت مذکور از حساسیت و ویژگی نسبتاً مطلوبی برخوردار بوده و نتایج آن قابل ارزیابی کیفی است. برای انجام آزمون الایزای مورد نظر، محتویات کیت به همراه پلیت پوشانده شده با آنتیژن‌های اختصاصی سنتتیک HEV، تحت عنوان Reagent، طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور ابتدا سرم‌های فریز شده در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس، همگی در دمای آزمایشگاه از حالت فریز خارج شدند. عمل مذکور در داخل یک پلیت ۹۶ خانه‌ای تم‌یز که در داخل کیت فوق موجود بود، انجام شد. پیش از شروع این مرحله از کار، ابتدا نقشه‌ای از پلیت بر روی کاغذ ته‌ی و بر روی آن، محل و تعداد خانه‌های مربوط به نمونه‌های هر گروه مورد مطالعه، مشخص شد. سه خانه ابتدایی ردیف اول در سمت چپ و سه خانه انتهایی ردیف آخر در سمت راست، به کنترل‌های مثبت و منفی آزمون اختصاص داده شد. مطابق دستورالعمل کیت و نقشه طرح‌شده، از سمت چپ ردیف اول و از خانه چهارم آن ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم به هر خانه منتقل گردید. این کار تا خانه نهم ردیف آخر ادامه یافت و بدین ترتیب ۹۰ نمونه سرم رقیق‌شده برای انتقال به پلیت اصلی آماده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل نرمال یا منفی به خانه‌های شماره ۲ و ۹۴ و ۹۶ اضافه گردید و خانه‌های شماره ۱، ۳ و ۹۵ نیز توسط پیت ۱۰۰ میکرولیتر از سرم کنترل مثبت پر شد. پس از آماده نمودن سرم‌ها و مواد پلیت اصلی کیت که با آنتیژن HEV پوشانده شده است آماده و به‌تمامی ۹۶ خانه آن از محتویات هر خانه در پلیت اول، دقیقاً به خانه مشابه در پلیت اصلی منتقل گردید. مراحل شست و شو، افزودن کونژوگ و گرم‌خانه‌گذاری نیز طبق دستورالعمل کیت انجام شد و نهایتاً قرائت نتایج توسط دستگاه الایزا ریدر انجام گردید. نتایج آزمایش‌ها با استفاده از یک cut-off تعیین‌شده با فرمول زیر بر روی مقدار می‌انگین OD ۴۵۰ نانومتر کنترل منفی (NC) محاسبه شد:

$$NC + 0.250 = \text{Cut-Off (Co)}$$

-آزمایش‌های خون‌شناسی

آزمایش‌های خون‌شناسی در این تحقیق با استفاده از نمونه‌گیری خون از حیوانات دربخش بیماری‌های داخلی دام‌های کوچک بیمارستان دامپزشکی دانشگاه آزاد تبریز انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه شمارشگر سلولی (Cell Counter) شرکت مایندری ساخت کشور چین به صورت خودکار، پارامترهای مختلفی مانند گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها، غلظت هموگلوبین و هماتوکریت اندازه‌گیری گردید. استفاده از این دستگاه اتوماتیک باعث افزایش دقت و تکرارپذیری نتایج و کاهش خطای انسانی در مقایسه با روش‌های دستی می‌شود (Rejec et al., 2017).

-آزمایش‌های مربوط به سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون

آزمایش‌های بیوشیمیایی سرم خون به منظور بررسی وضعیت عملکردی اندام‌ها و متابولیسم حیوان انجام شد. در این روش، پس از نمونه‌گیری و جداسازی سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ (اپندورف ساخت کشور آلمان)، نمونه‌ها به دستگاه‌های آنالایز بیوشیمیایی (شرکت مایندری ساخت کشور چین) وارد شدند تا پارامترهای مختلفی مانند پروتئین کل، آلومین، اوره، کراتینین، آنزیم‌های کبدی، گلوکز، چربی‌ها و الکترولیت‌ها اندازه‌گیری شود. این آنالیزها اطلاعات مهمی درباره سلامت کلی حیوان و وجود اختلالات متابولیسمی یا عملکردی فراهم می‌کند.

استفاده از دستگاه‌های اتوماتیک آنالایز بی‌وشی می‌آیی ضمن افزایش دقت و سرعت انجام کار، قابلیت تکرارپذیری بالایی را نیز فراهم می‌آورد (Boes et al., 2018).

-تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصله در تحقیق، بصورت توصیفی ارائه و با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار spss مورد تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین مقادیر $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

-نتایج مربوط به آزمایش الایزا

نتایج حاصله از آزمون الایزای انجام گرفته نشان داد که از میان کل نمونه‌های آزمایش شده، در میکروپلیت ۹۶ خانه دستگاه الایزا ریدر، تنها یک نمونه (C₄) دارای OD در محدوده مثبت بود (۰/۵ درصد نمونه‌ها) و سایر نمونه‌ها هیچ‌کدام در محدوده آلودگی به ویروس هپاتیت E قرار نگرفتند (۹۹/۵ درصد نمونه‌ها). نمونه آلوده شناسایی شده، مربوط به یک قلاذه گربه نر ۳ ساله‌ای بود که به‌صورت خانگی نگهداری شده بود و غذای تجاری مورد استفاده برای او، غذای تجاری رویال بوده و آب مورد استفاده هم، آب لوله‌کشی بوده است.

-نتایج مربوط به آزمایش‌های خون‌شناسی

یافته‌های ارائه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که مقدار متوسط غلظت هموگلوبین، همچنین درصد نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها، تحت تأثیر آلودگی به ویروس هپاتیت E قرار گرفته و با شرایط بیماری دچار تغییر شده‌اند.

جدول ۱- نتایج آزمایش‌های خون‌شناسی مربوط به گربه آلوده به ویروس هپاتیت E

فاکتور بررسی شده	نتیجه حاصله	واحد مربوطه	محدوده طبیعی
گلبول سفید	۱۲/۷	۱۰ ^۳ در میکرولیتر	۵/۵ - ۱۸
گلبول قرمز	۷/۸۷	۱۰ ^۶ در میکرولیتر	۵/۷ - ۸/۵
هموگلوبین	۱۱/۴	گرم در دسی‌لیتر	۱۴/۱ - ۲۰/۱
هماتوکریت	۳۹/۵	درصد	۴۱ - ۵۸
اندازه گلبول‌های قرمز	۵۰/۲	فمتولیت	۶۴ - ۷۶
میانگین هموگلوبین سلولی	۱۴/۵	پیکوگرم	۲۱ - ۲۶
متوسط غلظت هموگلوبین	۲۸/۹	گرم در دسی‌لیتر	۳۳ - ۳۶
پلاکت	۱۹۷	۱۰ ^۳ در میکرولیتر	۱۸۴ - ۵۴۵
نوتروفیل	۹۴	درصد	۴۵ - ۶۴
لنفوسیت	۶	درصد	۲۵ - ۳۵
مونوسیت	۱	درصد	۱ - ۶
ائوزینوفیل	۱	درصد	۱ - ۱۲
باندسل	۱	درصد	۱ - ۳

-نتایج مربوط به آزمایش‌های سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون

یافته‌های ارائه شده در جدول ۲ هم نشان می‌دهد که از میان شاخص‌های بیوشیمیایی خون، مقدار اوره، تری‌گلیسیرید، پروتئین کل، فسفر و نیز میزان فعالیت آنزیم کراتین فسفوکیناز در گربه آلوده به ویروس هپاتیت E دستخوش تغییر شده است.

جدول ۲- نتایج آزمایش‌های سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون مربوط به گربه آلوده به ویروس هپاتیت E در تحقیق حاضر

فاکتور بررسی شده	نتیجه حاصله	واحد مربوطه	محدوده طبیعی
اوره	۸۹	میکروگرم در دسی‌لیتر	۳۵-۷۵
کراتینین	۱/۶۲	میکروگرم در دسی‌لیتر	۲/۱-۰/۸
اوری کاسی‌د	۱/۲۲	میکروگرم در دسی‌لیتر	۰/۳-۰/۱
کلسترول	۱۳۰	میکروگرم در دسی‌لیتر	۱۰۰-۳۲۰
تری‌گلیسیرید	۱۵۳	میکروگرم در دسی‌لیتر	۳۰-۱۱۰
آسپاراتات ترانس آمیناز	۳۹۹	واحد بین‌المللی در لیتر	۱۷-۴۸
آلانین آمینوترانسفراز	۲۸۸	واحد بین‌المللی در لیتر	۲۸-۱۰۹
آلکالین فسفاتاز	۸۶	واحد بین‌المللی در لیتر	۱۱-۴۹
بیلی‌روبین تام	۰/۲۳	میکروگرم در دسی‌لیتر	۰/۱ - ۰/۶
گاما گلوتامیل ترانسفراز	۹/۶	واحد بین‌المللی در لیتر	۰-۸
پروتئین کل	۴/۸۲	گرم در دسی‌لیتر	۵/۵ - ۸
آلبومین	۲/۵۶	گرم در دسی‌لیتر	۲/۴ - ۴
کلسیم	۸	میکروگرم در دسی‌لیتر	۸/۲ - ۱۱
فسفر	۷/۳	میکروگرم در دسی‌لیتر	۲/۶ - ۵/۴
سدیم	۱۴۸	میلی‌اکی‌والان در لیتر	۱۴۹-۱۵۸
پتاسیم	۴/۹	میلی‌اکی‌والان در لیتر	۳/۸ - ۵/۵
کراتین فسفوکیناز	۶۷۰۰	واحد بین‌المللی در لیتر	۷۴-۳۸۶

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصله از آزمون الایزای غیرمستقیم انجام گرفته در تحقیق حاضر نشان داد که از میان تعداد ۲۰۰ نمونه سرم خون آزمایش شده، تنها یک نمونه مثبت بود (۰/۵ درصد نمونه‌ها) و سایر نمونه‌ها هیچ‌کدام در محدوده آلودگی سرولوژیکی به ویروس هپاتیت E قرار نگرفتند (۹۹/۵ درصد نمونه‌ها) که نمونه آلوده شناسایی شده، مربوط به یک قلابه گربه نر ۳ ساله بود. در این خصوص، مطالعاتی بسیار محدود درباره شیوع بیماری هپاتیت E در گربه‌ها انجام گرفته است، هرچند مطالعاتی وجود دارد که به شیوع آلودگی به ویروس مذکور در گربه‌ها هم می‌پردازد که به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود. در این راستا بررسی‌های انجام‌شده در کشورهای آسی‌ایی، می‌زان شیوع سرمی ویروس هپاتیت E را در گربه‌ها از ۱/۹ درصد تا ۳۳ درصد گزارش کرده‌است (Liang et al., 2014, Mochizuki et al., 2006, Okamoto et al., 2004). بر این اساس، پراتا و همکاران در سال ۲۰۰۹ در اسپانیا حضور آنتی‌بادی‌های

ضد ویروس هپاتیت E را در حیوانات اهلی و جوندگان با استفاده از آزمون ELISA مبتنی بر ارزیابی تیپ ۳ ویروس مذکور را مطالعه کردند که مثبت بودن شیوع سرمی در مورد گربه‌ها ۱۱/۱۱ درصد بود (Peralta et al., 2009). این نتیجه گویای آلودگی بالاتر نسبت به یافته‌های مطالعه حاضر است (۰/۵ درصد). احتمالاً علت این تفاوت را می‌توان در ژنوتیپ مورد بررسی تحت روش الیزا در نظر گرفت که در دو مطالعه متفاوت بود و لذا نتایج دقیقی‌تری را به نسبت به مطالعه حاضر ارائه کرده است. لیانگ و همکاران در سال ۲۰۱۴، شیوع سرمی ویروس هپاتیت E در بین گربه‌های خانگی در چندین شهر توسعه‌یافته در چین را بررسی نمودند. این بررسی سرواپی‌دمی و ولوژی‌ک از سال ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۳ در ۵ شهر شامل پکن، شانگهای، کانتون، شنژن و ماکائو با روش ای‌مونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA) انجام گرفت که شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E در ۱۹۱ نمونه، ۶/۲۸ درصد بود. همچنین گزارش کردند که گربه‌های خانگی مسن‌تر در معرض خطر بالایی برای مثبت شدن بودند اما هیچ رابطه معنی‌داری بین جنسیت گربه‌ها و گروه سنی مختلف گربه‌ها، مشاهده نشد. علاوه بر این، مشخص شد که گربه‌های خانگی که غذای مشترکی مانند باقی‌مانده‌های آشپزخانه را با جمعیت عمومی به اشتراک می‌گذارند، در معرض خطر بی‌شتری برای ابتلا به ویروس هپاتیت بودند. لذا نتیجه گرفتند که بقایای آشغال و آشپزخانه، ممکن است یک خطر بالقوه برای انتقال HEV از انسان به حیوانات خانگی باشد (Liang et al., 2014). علی‌رغم این که تعداد نمونه‌های بررسی شده در تحقیق حاضر (۲۰۰ نمونه سرم) با تعداد نمونه‌های مطالعه فوق نزدیک است ولی نتایج متفاوت، یعنی شیوع سرمی ۰/۵ درصد ویروس هپاتیت E در مقابل شیوع سرمی بالای ۶ درصد، عدم همخوانی بین یافته‌های دو مطالعه را نشان می‌دهد. داهنرت و همکاران در سال ۲۰۱۸ در آلمان ارزیابی سروولوژی‌کی ویروس هپاتیت E در گوشت‌خواران وحشی و اهلی را به انجام رساندند و اعلام کردند که ۳۲/۳ درصد از گربه‌ها آلوده به ویروس هپاتیت E هستند (Dähnert et al., 2018). آلودگی سرمی بسیار بالا و متفاوت در تحقیق‌های فوق نسبت به یافته‌های مطالعه حاضر، ممکن است به علت نحوه نگهداری گربه‌ها (ولگرد) در عمده نمونه‌های مورد مطالعه باشد که با نمونه‌های تحقیق حاضر که مربوط به خون گربه‌های خانگی بود، متفاوت است. همچنین در یک بررسی دیگر در هلند، موارد مثبت آنتی‌بادی ضد ویروس هپاتیت E را در گربه‌های خانگی ۱۴/۸۹ درصد نشان دادند و بی‌ان داشتند فاکتور رژیم غذایی در کشورهای مختلف به دلایل تنوع در گوشت خام مصرفی در غذای گربه‌ها ممکن است متفاوت باشد که می‌تواند بر وقوع و شیوع این بی‌ماری تأثیرگذار باشد (Li et al., 2020). کاپوزا و همکاران در سال ۲۰۲۱، بررسی عفونت ناشی از ویروس هپاتیت E در گربه‌های خانگی را در ایتالیا به انجام رساندند. در این مطالعه، با ارزیابی سروولوژی‌کی و مولکولی سرم تعداد ۳۲۴ قلاده گربه خانگی از منطقه آپولیا (ایتالیا)، آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E با شیوع کلی ۳/۱ درصد شناسایی شد که این یافته، شیوع پایین سرمی هپاتیت E گربه‌ها در محیط جغرافیایی مورد بررسی را نشان داد (Capozza et al., 2021). نتایج مطالعه فوق، با یافته‌های تحقیق حاضر که شیوع سرمی ویروس هپاتیت E را ۰/۵ درصد ارزیابی کرد تا حدودی همخوانی دارد. کابالیرو گومز و همکاران در سال ۲۰۲۲، شیوع سروولوژی‌کی ویروس هپاتیت E در گربه‌های اسپانیای را مورد بررسی قرار دادند. بدین منظور بین سال‌های ۲۰۱۷ تا ۲۰۲۰، نمونه خون از تعداد ۱۴۴ قلاده گربه ولگرد جمع‌آوری کرده و حضور آنتی‌بادی‌های ضد ویروس

هپاتیت E را با استفاده از روش ساندویچ ELISA، با در نظر گرفتن دو آنتی ژن متفاوت، مورد ارزیابی قرار دادند. اعلام کردند که شیوع سرمی ویروس مذکور در گربه‌ها، ۲/۸ درصد می‌باشد (Caballero-Gómez et al., 2022). نتایج مطالعه فوق هم، با یافته‌های تحقیق حاضر که شیوع سرمی ویروس هپاتیت E در گربه‌ها را با استفاده از روش الایزای غیرمستقیم، ۰/۵ درصد ارزیابی کرده، تا حدودی هم‌خوانی دارد. کاگیرگان و همکاران در سال ۲۰۲۲، اولین شواهد از قرار گرفتن در معرض ویروس هپاتیت E در گربه‌های خانگی در ترکیه را گزارش کردند. در این مطالعه، سرم ۹۱ گربه خانگی با استفاده از نوعی روش سرولوژیکی نسل جدید (سنجش ای‌مونوسوربنت متصل به آنزیم ELISA) مورد مطالعه قرار گرفت و شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E، ۵/۴ درصد تعیین شد. همچنین توزیع سرمی مثبت در گروه سنی ۰ تا ۲ سال، ۳/۲ درصد، در گروه سنی ۲ تا ۸ سال، ۱/۰۹ درصد و در گربه‌های بالای ۸ سال، ۱/۰۹ درصد بود، هرچند تفاوت آماری معنی‌داری در میزان شیوع سرمی گربه‌های مربوط به گروه‌های سنی و جنسیتی متفاوت، وجود نداشت. نامبردگان اعلام کردند که یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که گربه‌ها در ترکیه، شیوع سرمی پایینی از آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E دارند. البته با این وجود، تحقیق فوق از نظر تشخیصی ضرورت آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E در گربه‌ها برای اولین بار در ترکیه، مهم بود (Cagiran et al., 2022). تساکیف و همکاران در سال ۲۰۲۳، اولین ارزیابی سرواپی‌دمی‌ولوژی آلودگی به ویروس هپاتیت E در سگ‌ها، گربه‌ها، اسب‌ها، گاوها، گوسفندان و بزهای بلغارستان را به انجام رساندند که در طی آن مجموعاً، ۷۲۰ نمونه سرم به‌طور تصادفی جمع‌آوری شد که ۹۰ نمونه به گربه‌ها تعلق داشت. نمونه‌های سرم با استفاده از کیت تجاری ELISA مورد آزمایش قرار گرفتند و شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E در میان گربه‌های بلغارستان ۱۷/۷ درصد گزارش شد. همچنین اعلام کردند که بطور کلی در نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند و بز) مثبت بودن حضور آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E، بالا، در حیوانات خانگی (سگ و گربه) در حد متوسط و در حیوانات بزرگ (اسب و گاو) در سطح پایینی قرار دارد (Tsachev et al., 2023). آلودگی به ویروس هپاتیت E با اختلاف بالا در گربه‌های بلغارستان شرایط متفاوتی را نسبت به مطالعه حاضر پدید آورده است که به نظر می‌رسد، علت این تفاوت، در نحوه نگهداری جمعیت مورد مطالعه فوق بوده که عمدتاً ولگرد بوده‌اند و اما در مطالعه حاضر خانگی می‌باشند. از طرف دیگر پیشکه و همکاران در سال ۲۰۲۳، شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E را در مجموع ۳۶۵ نمونه سرم مربوط به حیوانات آلمان (۱۲۴ قلاده سگ، ۱۱۹ قلاده گربه و ۱۲۲ رأس اسب) توسط ELISA تجاری مورد آزمایش قرار دادند. براساس نتایج، شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت E، به‌طور قابل‌توجهی بین سگ‌ها (۱۰ درصد)، گربه‌ها (۶ درصد) و اسب‌ها (۲ درصد) متفاوت بود. اما میزان آنزیم‌های مرتبط با آسیب کبدی، شامل آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز هیچ تفاوتی بین حیوانات مثبت و منفی از نظر شیوع سرمی فوق، نشان ندادند. البته نامبردگان اعلام کردند که مطالعه سرولوژیکی آن‌ها نشان می‌دهد که سگ‌ها و گربه‌ها در آلمان، به‌طور قابل‌توجهی در معرض ویروس هپاتیت E قرار دارند (Pischke et al., 2023). ملاحظه می‌شود در مطالعه فوق، میزان آلودگی به ویروس هپاتیت E در گربه‌های آلمان تفاوت چندانی با گربه‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر در ایران ندارد ولی در تغییرات مربوط به آنزیم‌های کبدی، نتیجه کاملاً معکوس می‌باشد، چرا که

آنزیم‌های مذکور در مورد گربه مثبت مطالعه حاضر، دچار تغییرات شدید شده‌اند و از این‌رو مطالعه حاضر با نتیجه تحقیق مذکور در این خصوص همخوانی ندارد. هر چند نکته قابل‌توجه در این آزمایش تغییرات بالا و عمده‌ای جادشده در آنزیم‌های کبدی است که ناشی از آسیب‌رسانی ویروس به کبد می‌باشد. تورلویزش و همکاران در سال ۲۰۲۴، شواهد موجود از عفونت ویروس هپاتیت E در می‌ان گربه‌های خانگی در لهستان را بررسی نمودند. بدین منظور در مجموع، نمونه‌های سرمی تهیه شده از خون تعداد ۹۰ قلاده گربه را انتخاب و جهت جستجوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی ای‌مونوگلوبولین ضد HEV-3 از کلاس IgG را با استفاده از روش ELISA تجاری مورد آزمایش قرار دادند. براساس نتایج، اصلاً آنتی‌بادی‌های مذکور در هیچ‌یک از نمونه‌های فوق مشاهده نشد و لذا اعلام کردند که شواهدی مبنی بر عفونت ناشی از ویروس هپاتیت E وجود نداشت (Turtlewicz-Podbielska et al., 2024).

از طرف دیگر تغییرات ملاحظه شده در تعداد نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها در خون گربه‌های تحقیق حاضر مطابق جدول ۱، با توجه به مثبت بودن آلودگی سرمی به ویروس هپاتیت E کاملاً توجیه‌پذیر است، چراکه به علت درگیری سیستم ایمنی حیوان، این تغییرات روی داده است. همچنین تغییر مشاهده شده در شاخص مهم متوسط غلظت هموگلوبین خون نیز ناشی از آسیب وارده به کبد و اختلال در تولید پروتئین‌های مؤثر در خون می‌باشد (جدول ۱).

هم چنین نتایج به‌دست‌آمده از جدول ۲ نشان می‌دهد که از میان شاخص‌های بیوشیمیایی، مقادیر اوره، تری‌گلیسیرید، پروتئین کل، فسفر و CPK در بیمار آلوده به ویروس هپاتیت E دستخوش تغییر شده‌اند. نکته قابل‌توجه در این آزمایش تغییرات بالا و عمده‌ای جادشده در آنزیم‌های کبدی است که ناشی از آسیب کبد توسط ویروس است.

به‌طورکلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آلودگی چندانی در گربه‌های شهر تبریز به هپاتیت E وجود ندارد و احتمالاً می‌توان در این مورد نگرانی‌ها را تا حدودی کاهش داد. البته به نظر می‌رسد که اظهار نظر قطعی در این خصوص، مستلزم استفاده از کیت‌های تشخیصی اختصاصی دامی و نیز روش‌های جدید تشخیصی، نظیر روش‌های نوین مولکولی است.

سپاسگزاری

نظر بر این‌که اطلاعات ارائه‌شده در مقاله حاضر برگرفته از یافته‌های پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی نویسنده اول (۱۰۲۳۲۸۱۳۷۷۴۱۲۵۳۹۷۰۲۲۱۶۲۷۸۴۳۱۹) می‌باشد، لذا بدین‌وسیله از تمامی کارکنان و مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز و کارشناسان آزمایشگاه‌های دانشکده دامپزشکی تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین از مساعدت‌های مسئول فنی آزمایشگاه تخصصی ویروس‌شناسی در تبریز، آقای دکتر علی‌اکبر رحیم رحیمی، سپاسگزاری می‌گردد.

- Aggarwal, R. (2013). Diagnosis of Hepatitis E. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(1): 24-33.
- Aslan, A.T. and Balaban, H.Y. (2020). Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 26(37): 43-55.
- Caballero-Gómez, J., Rivero-Juarez, A., Jurado-Tarifa, E., Jiménez-Martín, D., Jiménez-Ruiz E., CastroScholten S., *et al.* (2022). Serological and molecular survey of Hepatitis E virus in cats and dogs in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2): 240-248.
- Cagiran, A.A., Yildirim, Y. and Okulmus, C. (2022). The first evidence of zoonotic Hepatitis E virus (HEV) exposure in domestic cats in Türkiye. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 86(1): 10-20.
- Capozza, P., Martella, V., Lanave, G., Beikpour, F., Di Profio, F., Palombieri, A., *et al.* (2021). A surveillance study of Hepatitis E virus infection in household cats. *Research in Veterinary Science*, 137(1): 40-43.
- Cooper, K., Huang, F.F., Batista, L., Rayo, C., Bezanilla, J., Toth, T.E., *et al.* (2005). Identification of genotype 3 Hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4): 1684-1688.
- BOES, K. M., SINK, C. A., CAMUS, M. S. & WERRE, S. R. 2018. Evaluation of an in-clinic dry chemistry analyzer for canine, equine, and feline plasma samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30, 902-910.
- Dähnert, L., Conraths, F., Reimer, N., Groschup, M. and Eiden, M. (2018). Molecular and serological surveillance of Hepatitis E virus in wild and domestic carnivores in Brandenburg, Germany. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(5): 1377-1380.
- Goens, S.D. and Perdue, M.L. (2004). Hepatitis E viruses in humans and animals. *Animal Health Research Reviews*, 5(2): 145-156.
- Izopet, J., Tremeaux, P., Marion, O., Miguères, M., Capelli, N., Chapuy-Regaud, S., *et al.* (2019). Hepatitis E virus infections in Europe. *Journal of Clinical Virology*, 120(1): 20-126.
- Kabrane-Lazizi, Y., Meng, X.J., Purcell, R.H. and Emerson, S.U. (1999). Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *Journal of Virology*, 73(10): 8848-8850.
- Kuno, A., Ido, K., Isoda, N., Satoh, Y., Ono, K., Satoh, S., *et al.* (2003). Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatology Research*, 26(3): 237-242.
- Li, L., Zhu, Y., Fu, H., Wei, X., Wang, L., Liang, J., *et al.* (2009). Full genome nucleotide sequence and analysis of a Chinese swine hepatitis E virus isolate of genotype 4 identified in the Guangxi Zhuang autonomous region: evidence of zoonotic risk from swine to human in South China. *Liver International*, 29(8): 1230-1240.
- Li, Y., Qu, C., Spee, B., Zhang, R., Penning, L.C., de Man, R.A., *et al.* (2020). Hepatitis E virus seroprevalence in pets in the Netherlands and the permissiveness of canine liver cells to the infection. *Irish Veterinary Journal*, 73(1): 1-5.
- Liang, H., Chen, J., Xie, J., Sun, L., Ji, F., He, S., *et al.* (2014). Hepatitis E virus serosurvey among pet dogs and cats in several developed cities in China. *PLoS One*, 9(6): 68-98.
- Lyoo, K.S., Yang, S.J., Na, W. and Song, D. (2019). Detection of antibodies against hepatitis E virus in pet veterinarians and pet dogs in South Korea. *Irish Veterinary Journal*, 72(1): 1-3.

- Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S. and Arbiza, J. (2014). Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, 20(14): 45-59.
- Meng, X. (2010). Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Veterinary Microbiology*, 140(3): 256-265.
- demiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *The Veterinary Record*, 159(25): 853-855.
- Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Usui, R. and Kobayashi, E. (2004). Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection*, 32(1): 57-58.
- Peralta, B., Casas, M., de Deus, N., Martín, M., Ortuño, A., Pérez-Martín, E., *et al.* (2009). Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Veterinary Microbiology*, 137(1): 66-73.
- Pischke, S., Knoop, E., Mader, M., Kling, L., Wolski, A., Wagner, A., *et al.* (2023). Anti-HEV seroprevalence and rate of viremia in a German cohort of dogs, cats, and horses. *Scientific Reports*, 13(1): 19-24.
- Purcell, R.H., Engle, R.E., Rood, M.P., Kabrane-Lazizi, Y., Nguyen, H.T., Govindarajan, S., *et al.* (2011). Hepatitis E virus in rats, los angeles, california, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12): 2216-2217.
- Stiles, J. (2014). Ocular manifestations of feline viral diseases. *The Veterinary Journal*, 201(2): 166-173.
- Tsachev, I., Gospodinova, K., Pepovich, R., Takova, K., Kundurzhiev, T., Zahmanova, G., *et al.* (2023). First Insight into the Seroepidemiology of Hepatitis E Virus (HEV) in Dogs, Cats, Horses, Cattle, Sheep and Goats from Bulgaria. *Viruses*, 15(7): 1594-1599.
- Turlewicz-Podbielska, H., Ruszkowski, J.J., Wojciechowski, J. and Pomorska-Mól, M. (2024). No evidence of Hepatitis E virus (HEV) infection among pet cats, dogs and low seroprevalence of Hepatitis E virus among pet rabbits in Poland. *Veterinary Research Communications*, 48(1): 597-602.
- Walker, C.M. (2019). Adaptive immune responses in Hepatitis A virus and Hepatitis E virus infections. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(9): 33-47.
- Yoo, D., Willson, P., Pei, Y., Hayes, M.A., Deckert, A., Dewey, C.E., *et al.* (2001). Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(6): 1209-1213.
- Zeng, M., Gao, H., Yan, X., Qu, W., Sun, Y., Fu, G., *et al.* (2017). High Hepatitis E virus antibody positive rates in dogs and humans exposed to dogs in the south-west of China. *Zoonosis and Public Health*, 64(8): 684-688.

Investigation of Hepatitis E Infection Status in Domestic Cats with Diarrhea and Vomiting Symptoms Based on Detection of Specific Anti-Hepatitis E Virus Antibodies by Indirect ELISA and Measurement of Certain Serum Biomarkers

Jahanbakhshi, E.¹, Neshat Gharamaleki, M.^{2*}, Anzabi, Y.³

1- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, TaMS.C., Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, TaMS.C., Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, TaMS.C., Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

*Corresponding author's email: Neshatpetvet@yahoo.com

Abstract

Pet animals are often exposed to the zoonotic hepatitis E virus, and thus, anti-hepatitis E virus antibody levels are potentially higher among veterinarians and workers at pet breeding and care centers. Although the clinical symptoms of hepatitis E in cats have not been well described, evidence of the presence of anti-hepatitis E virus antibodies in the sera of cats with diarrhea and vomiting symptoms has been largely demonstrated. Therefore, the present study aimed to detect hepatitis E virus infection in domestic cats with diarrhea and vomiting symptoms, based on the detection of specific anti- HEV antibodies using indirect ELISA and the measurement of some serum parameters. For this purpose, 100 domestic cats showing diarrhea and vomiting symptoms and 100 apparently healthy domestic cats referred to the specialized hospital of the Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Medical Sciences branch (for reasons other than gastrointestinal disease), were selected by simple random sampling. Blood samples were collected from all cats, and hematological tests were performed. After serum preparation and biochemical evaluation, indirect ELISA and a relevant specific kit were used for laboratory diagnosis of hepatitis E. According to the findings, only one sample (0.5% of cases) was seropositive (the blood sample of a 3-year-old male domestic cat). Furthermore, increased values of mean hemoglobin concentration, neutrophils, and lymphocytes in blood, as well as elevated levels of urea, triglycerides, total protein, phosphorus, and serum creatine phosphokinase enzyme, were observed in the corresponding sample. The seroprevalence of the hepatitis E virus in domestic cats in Tabriz city was recorded as very low.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Diarrhea, Hepatitis E, Household cats, Indirect ELISA, Vomiting.