

اولین گزارش وقوع میلوانسفالوپاتی ناشی از هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی در ایران

تقی تقی‌پوربازرگانی^۱، حسن ممتاز^{۲*}، فریدرضا بهارلو^۳ و مهدی غفاری^۴

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۵

چکیده

میزان شیوع و سبب شناسی هرپس ویروس ۱ و ۴ اسب در ایران ناشناخته است. با توجه به پیشرفت قابل توجه صنعت اسب‌داری و پرورش اسب در چند ساله‌ی اخیر در کشور و نیز مشاهده‌ی مواردی از عفونت‌های بالینی عصبی در اسب‌های بعضی از مناطق ایران، این مطالعه برای اولین بار به منظور جداسازی هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی از موارد مشکوک به میلوانسفالوپاتی در اسب‌داری‌های شهرستان گلپایگان، انجام پذیرفت. در این بررسی، از ۳ مادیان متعلق به اسب‌داری‌های شهرستان گلپایگان که دارای علائم بالینی بی‌اشتهایی، افسردگی، آتاکسی و زمین‌گیری و مشکوک به آنسفالیت هرپس ویروسی بودند، نمونه‌ی خون گرفته شد. از بافی کوت استخراج شده از نمونه‌ها جهت تلقیح در حفره‌ی آلتوتویک تخم‌مرغ جنین‌دار و محیط کشت سلولی RBK، استفاده شد. DNA ژنومی از هر دو نمونه‌ی مایع آلتوتویک و مایع کشت سلولی استخراج و جهت ردیابی حضور *EHV-1* به روش PCR، ارزیابی شد. نتایج نشانگر حضور DNA مربوط به *EHV-1* در هر سه نمونه بود.

کلمات کلیدی: میلوانسفالوپاتی، هرپس ویروس تیپ ۱ اسب، ایران

مقدمه

(2012). حضور این ویروس‌ها از کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته دارای صنعت پرورش اسب به فراوانی گزارش شده است (Carvalho et al. 2000). این ویروس‌ها یکی از عوامل مهم در ایجاد خسارات اقتصادی فراوان به صنعت پرورش اسب می‌باشند (Pusterla et al. 2006).

از بین *آلفا* هرپس ویروس‌های شناخته شده در اسب، دو *آلفا* هرپس ویروس ۱ و ۴، به عنوان پاتوژن‌های مهم در سراسر جهان برای جمعیت اسب‌ها در نظر گرفته می‌شوند. هرپس ویروس‌های ۱ و ۴ اسب از لحاظ ژنتیکی با یکدیگر قرابت نزدیک دارند و توالی نوکلئوتیدی ژنوم این دو ویروس حدود ۸۵-۶۵ درصد، تشابه ژنتیکی دارد (Patel and Heldens 2005).

در بین حیوانات گوناگونی که در دامپزشکی اهمیت خاصی برای آن‌ها قایل هستیم، اسب جایگاه ویژه‌ای دارد. اسب حیوانی نجیب، تربیت‌پذیر و با ارزش است که از دیرباز با آدمیان زیسته و منافع فراوانی را برای آن‌ها به ارمغان آورده است. با توجه به این که پرورش اسب در سال‌های اخیر در ایران پیشرفت چشم‌گیری داشته است، انتظار افزایش موارد بروز بیماری‌های مختلف در این صنعت دور از انتظار نیست.

بررسی‌های اخیر نشان می‌دهند از بین تمام ویروس‌های ایجاد کننده‌ی بیماری در اسب‌ها، هرپس ویروس‌ها به دلیل گسترش جهانی و فراوانی بیماری‌هایی که ایجاد می‌کنند، یکی از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین پاتوژن‌های تهدید کننده‌ی سلامت اسب هستند (Burgess et al. 2005).

^۱ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران^{۲*} دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد^۳ دامپزشک بخش خصوصی، اصفهان^۴ کارشناس ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

ماکروسکوپی ارزیابی شد. خون ۳ اسب که علایم مشخص- تری را نشان می‌دادند در لوله‌های آزمایش حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA گرفته شد.

نمونه‌های خونی گرفته شده در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و بافی کوت مستخرج از آنها جهت تلقیح در حفره‌ی آلتوتئیک تخم‌مرغ جنین‌دار SPF و تیره‌ی سلولی RBK، استفاده شد.

DNA ژنومی از مایع آلتوتئیک تخم‌مرغ جنین‌دار و مایع آلوده‌ی کشت سلولی با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن ایران) طبق دستورالعمل کیت، استخراج و به منظور ردیابی هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی در نمونه‌های مورد مطالعه، از روش PCR، طبق روش توصیه شده توسط Carvalho و همکاران در سال ۲۰۰۰ استفاده شد.

محصول PCR مربوط به ۱ نمونه از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی ژن تکثیر یافته به شرکت MacroGen کره ارسال و به روش Sanger sequencing method سکانس گردید.

نتایج

در بررسی حاضر از مجموع ۲۸ اسب تروبرد موجود در یک باشگاه سوارکاری در شهرستان گلپایگان، ۱۷ مادبان علائم عصبی را نشان دادند که ۹ تا از آنها تلف شدند. دو مادبان تلف شده کالبدگشایی شدند و در معاینه‌ی بافت مغز از نظر ماکروسکوپی، میزان مایع مغزی زیادت‌تر از حد طبیعی بود و به دلیل بالا بودن میزان پروتئین به شکل زانتوکرومیا (مایع زرد روغنی) دیده شد و نرم-شدگی شیارهای مغز نیز قابل توجه بود. نتایج حاصل از تلقیح نمونه‌ای آماده شده در تخم‌مرغ جنین‌دار و کشت سلولی نشان داد که ویروس مورد نظر توانایی رشد در جنین تخم‌مرغ را دارد و پس از تلقیح منجر به مرگ جنین می‌شود. از طرفی ویروس مورد نظر توانایی بالایی در ایجاد CPE در تیره‌ی سلولی RBK، دارد.

عفونت ناشی از هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی سبب مرگ و میر در کره‌ها، اختلال تنفسی ناشی از پنومونی بینابینی، آتاکسی خفیف تا زمین‌گیری کامل، میلوانسفالوپاتی و در نهایت مرگ، می‌شود (Burgess et al. 2012). مدت زمان ظهور علائم عصبی ناشی از هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی، ۸-۱۲ ساعت پس از بروز علایم تنفسی، برآورد شده است (Slater 2007). فرم عصبی بیماری اغلب در مادبان‌های بالای ۳ سال و در نژادهای هیسپانیک، استاندارد برد یا دورانت و عموماً در فصول سرد (پاییز و زمستان) رخ می‌دهد (Slater 2007). در سال‌های اخیر موارد متفاوتی از بروز علایمی هم‌چون بی‌اشتهایی، تب بالا، آتاکسی و در نهایت مرگ در اثر زمین‌گیری در اسب‌های مناطق مختلف ایران، گزارش شده است، اما تا کنون هیچ بررسی‌ای مبنی بر تشخیص عامل اصلی این علائم، انجام نگرفته است و معمولاً درمان‌های انجام شده بر اساس علائم بیماری بوده‌اند، در این گزارش، برای اولین بار در ایران اقدام به ردیابی هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی در اسبان مشکوک به میلوانسفالوپاتی در شهرستان گلپایگان با استفاده از روش مولکولی شده است.

تاریخچه

از مهر ماه تا آذر ماه سال ۱۳۹۱، چندین مورد مشکوک به میلوانسفالوپاتی در اسب‌داری‌ها و باشگاه‌های سوارکاری شهرستان گلپایگان-اصفهان، گزارش گردید. پس از مراجعه دکتر دامپزشک مشخص شد که تمام اسب‌های ذکر شده علائمی از جمله بی‌اشتهایی، افسردگی، آتاکسی و زمین‌گیری را دارند. اسب‌های مبتلا مادبان‌های نژاد تروبرد دارای سن ۶ تا ۱۴ سال بودند. دکتر دامپزشک، مشکوک به میلوانسفالوپاتی شد. به منظور درمان اسب‌های مبتلا از دگزامتازون، فوروزماید، فلونکسین (بر اساس دز مؤثر) و سرم قندی-نمکی استفاده گردید. دو مورد از مادبان‌های تلف شده با علائم عصبی کالبدگشایی شد و ضایعات مغزی از نظر

در مطالعه‌ی انجام شده مادیان‌های مبتلا به فرم عصبی هرپس ویروس، بین ۶ تا ۱۴ سال سن داشتند. Henninger و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که میزان شیوع هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی در اسبان با سن بیش‌تر از ۵ سال، محتمل‌تر است.

Lara و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که مایع مغزی نخاعی اسبان مبتلا به فرم عصبی هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی، زرد رنگ و دانسیته‌ی بیش‌تری دارد و منبع خوبی برای جداسازی ویروس است. در مطالعه‌ی حاضر نیز در بررسی ضایعات مغزی در دو مادیان تلف شده از میلوانسفالوپاتی علایم فوق دیده شد، ولی برای اثبات فعال بودن *EHV-1* و توان ایجاد ویرمی و متعاقباً ایجاد عوارض نورولوژیک ناشی از تورم عروق مغزی از نمونه‌ی خون مربوط به مادیان‌های دارای علایم عصبی قبل از مرگ جهت ردیابی ویروس استفاده شد.

این مطالعه برای اولین بار در ایران وجود فرم عصبی *EHV-1* را به اثبات رسانید و نشان داد که استفاده از واکسن‌های موجود برای کنترل *EHV-1* کاملاً ضروری است؛ هر چند واکسن‌های موجود روی فرم عصبی بیماری تأثیر زیادی ندارند. از طرفی نشان داد که وقوع میلوانسفالوپاتی ناشی از *EHV-1* در اسب‌های باشگاه‌های ورزشی بسیار محتمل است. در نتیجه، اقدامات مدیریتی به منظور جلوگیری از وقوع بیش‌تر و پراکنده شدن این ویروس در ایران باید انجام گیرد.

پس از انجام واکنش PCR مشخص شد که هر ۳ نمونه خون اخذ شده از مادیان‌های مشکوک از نظر آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی مثبت و واجد قطعه‌ای به طول ۲۶۸ جفت باز در الکتروفورز بودند.

توالی نوکلئوتیدی محصول PCR مربوط به یکی از نمونه‌های مثبت شده در این آزمایش، با استفاده از سرویس BLAST در سایت NCBI، تأیید و مشخص شد که توالی تعیین شده متعلق به هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی می‌باشد.

بحث

بررسی‌های متفاوتی روی هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی در سراسر جهان انجام شده است. وقوع فرم عصبی *EHV-1* در کشورهای مختلف از جمله آمریکای شمالی، انگلستان، هلند، ایرلند و لهستان، گزارش شده است (Slater 2007, Wilson 1997). مرگ و میر بالای ناشی از *EHV-1* در مطالعه‌ی Patel و Heldens در سال ۲۰۰۵، تأیید شده است.

در بررسی حاضر تمامی اسب‌های مبتلا از نژاد ترورد بودند. اهمیت بالای میلوانسفالوپاتی ناشی از *EHV-1* در نژادهای مختلف اسب از جمله هیسپانیک، استاندارد برد، درات، عرب، ترکمن و ترورد در مطالعات قبلی مورد توجه قرار گرفته است (Pusterla et al. 2006, Wilson 1997).

منابع

- Burgess, B.A.; Tokateloff, N.; Manning, S.; Lohmann, K.; Lunn, D.P.; Hussey, S.B. et al. (2012). Nasal shedding of equine herpesvirus-1 from horses in an outbreak of equine herpes myeloencephalopathy in Western Canada. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(2): 384-392.
- Carvalho, R.; Oliveira, A.M.; Souza, A.M.; Passos, L.M. and Martins, A.S. (2000). Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Archives of Virology*, 145(9): 1773-1787.
- Henninger, R.W.; Reed, S.M.; Saville, W.J.; Allen, G.A.; Hass, G.F.; Kohn, C.W. et al. (2007). Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21: 157-165.
- Lara, M.C.C.S.H.; Cunha, E.M.S.; Villalobos, E.M.C.; Nassar, A.F.C.; Asano, K.M.; Fernandes, W.R. et al. (2008). First isolation of equine herpesvirus type 1 from a horse with neurological disease in Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 75(2): 221-224.

- Patel, J.R. and Heldens, J. (2005). Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Veterinary Journal*, 170: 14–23.
- Pusterla, N.; Wilson, W.D.; Conrad, P.A.; Barr, B.C.; Ferraro, G.L.; Daft, B.M. et al. (2006). Cytokine gene signatures in neural tissue of horses with equine protozoal myeloencephalitis or equine herpes type 1 myeloencephalopathy. *Veterinary Record*, 159: 341–346.
- Slater, J.; Equine herpesviruses. In: Sellon, D. and Long, M. (2007). *Equine Infectious Diseases*. St. Louis, USA, Saunders Elsevier, pp: 134–153.
- Wilson, W.D. (1997). Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics of North America, Equine Practice*, 13: 53–72.

The first report on myeloencephalopathy caused by *equine herpes virus type 1* in Iran

Taghipour Bazargani, T¹; Momtaz, H.²; Baharlo, F.R.³ and Ghafari, M.⁴

Received: 09.06.2013

Accepted: 24.02.2014

Abstract

The prevalence rate and etiology of *EHV-1* and *EHV-4* are essentially unknown in Iran. Also, according to the incredible distribution of horse supplies and breeding in recent years in the country and presence of several outbreaks of clinical nervous infections in horses of some areas of Iran, this study for the first time in Iran was carried out in order to isolate of *EHV-1* from susceptible cases of myeloencephalopathy in horse clubs of Golpayegan city. In this study the blood samples were collected from three horses of Golpayegan's horse clubs which had anorexia, depression, ataxia, and recumbence and were suspicious to herpes viral encephalitis. Samples extracted buffy-coat were used for inoculation in allantoic cavity of embryonated eggs and RBK cell culture. Genomic DNA was extracted from both allantoic and cell culture fluids and was evaluated for detection of *EHV-1* using PCR method. Results showed the presence of *EHV-1* in all three samples.

Key words: Myeloencephalopathy, *Equine Herpes Virus type 1*, Iran

1- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3- Private Veterinarians, Veterinary Organization of Iran, Isfahan, Iran

4- Bachelor of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Momtaz, H., E-mail: hamomtaz@yahoo.com