نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۶، پاییز ۱۳۹۱

جستجوی ویروس کم خونی عفونی اسب (EIAV) در مناطق غربی، شمالی و مرکزی ایران به روش Nested PCR

• **محمد رضا محزونیه**
دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
• **حسین طهماسبی** (نویسنده مسئول)
دانشجوی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
• **هادی منجی**
دانشجوی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
• **حسن ممتاز**
دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد
• **فاطمه یکتنه**
کارشناس آزمایشگاه گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
• **احمد سبزیان**
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
• **محمد فرج واجاری**
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
تاریخ‌دریافت: آذر ماه ۱۳۸۹ تاریخ‌پذیرش: آذر ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول:۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱
Email: h.tahmasby@yahoo.com

مقدمه

توسط رترو یروس کم خونی عفونی اسب ایجاد می شود. این بیماری با سیکل های ویرمی عود کننده و موارد کلینیکی پیوند می یابد و علائمی چون تب، کم خونی، ادم، ترمبوسیتوپنی دارد. حیوان در اثر بیماری حـاد یا مزمن ممکن است بمیرد (۷). بروز مراحـل کلینیکی، پاسخ ایمنی و سیر تکاملی ویروس در اسب ها و اسـب چه هـا یا پونی ها اثبات شده است (۱۱، ۱۵). همچنین مـوارد کلینیکی، آثار سرولوژی و ویرولوژی بعـد از عفونت هـای تجربی در الاغ ها دیده شده و در قاطرها حضور این ویروس و بروز بیماری گزارش شده اسـت (۴، ۱۶). در صـورت زنـده ماندن، ویروس برای تمام عمر در بدن دام باقـی می ماند و حیوان حامل و دفـع کننده ویروس می شـود (Howe). لذا جلوگیری از ورود این حیوانات بـه یک کشور از نظر تجاری از اهمیّت ویژه ای برخوردار است.

جدول ۱- نمونه گیری از اسب های استان های مورد پژوهش

منطقه نمونه گیری	لرستان	همدان	چهارمحال و بختیاری	گیلان	اصفهان	فارس	مجموع
اسب	۱۴	۵	۳	۲۰	۱۲	۴	۵۸
قاطر	۵	۱۲	-	-	-	-	۱۷
الاغ	۱۳	۳	۲۵	-	-	-	۴۱
مجموع	۳۲	۲۰	۲۸	۲۰	۱۲	۴	۱۱۶

تشخیص سرمی عفونت با این ویروس عموما بر اساس تست آگار ژل ایمونو دیفوزیون (AGID) استوار است ولی در اسب های آلوده که پاسخ موثر در برابر عفونت نداشته اند یا در مراحل ابتدایی آلودگی ویروسی هستند روش های تشخیص سرمی ممکن است نتایج منفی کاذب نشان دهند (۱۰). آزمایش PCR به عنوان یک روش دقیق و حساس در تشخیص عفونت با ویروس EIA به کار گرفته شده است (۱۰).

از آنجا که تاکنون مطالعه ای روی آلودگی الاغ و قاطر ها صورت نگرفته و مطالعات اندکی هم روی اسب ها انجام شده، مطالعه حاضر با هدف ردیابی پروویروس کم خونی عفونی اسب در اسب سانانی که از نظر ظاهری سالم بودند در مناطق غربی، شمالی و مرکزی ایران به روش nested PCR صورت گرفت.

سرم تعداد ۱۱۶ نمونه ی خون از اسب سانان مناطق مختلف لرستان، همدان، گیلان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان و فارس اخذ و و تا زمان انجام آزمایش در منهای ۱۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد (جدول۱).

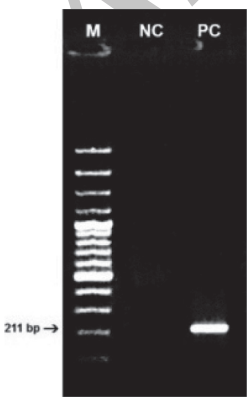
اسید نوکلئیک سرم ها با کیت استخراج High Pure Nucleic Acid (محصول شرکت Roche، ساخت آلمان) بر اساس دستورالعمل کیت، استخراج و با روش Nested PCR مورد آزمون قرار گرفت. برای این کار از پرایمر های توصیف شده توسط Nagarajan و همکاران (ساخت سیناژن، ایران) استفاده گردید (۱۳).

با استفاده از پرایمر های خارجی P۱ و P۲، اولین مرحله ی تکثیر برای رشته ی ۶۱۰ جفت بازی و دومین مرحله تکثیر نیز با استفاده از پرایمر های داخلی P۴ و P۵، برای ازدیاد رشته ی ۲۱۰ جفت بازی داخلی انجام شد. برای مرحله ی اول PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، ۰/۱۵ میلی مول $MgCl_2$، ۰/۰۲ میلی مول dNTP ، ۲/۵ U آنزیم Taq پلی مراز، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA الگو) و برای مرحله ی دوم PCR نیز در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR ، ۰/۱۵ میلی مول MgCl۲، ۰/۰۲ میلی مول dNTP ، ۲/۵ U آنزیم Taq پلی مراز، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر از محصول مرحله اول) صورت گرفت. برنامه دمایی برای پرایمرهای داخلی و خارجی مطابق با برنامه حرارتی Nagarajan و همکاران در دستگاه ترموسایکلر (Biorad، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت (۱۳). در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد (ساخت سیناژن، ایران) الکتروفورز (ساخت پایاپژوهش پارس، ایران) گردید. برای نمونه های کنترل مثبت و منفی نیز به همین ترتیب عمل شد.

در این مطالعه در میان نمونه های ارزیابی شده هیچ نمونه مثبتی به دست نیامد.

آلودگی به EIA تاکنون از چندین کشور گزارش شده است (۱۴،۱۳،۱۲). اما در بعضی از مطالعات، علی رغم جامعه آماری نسبتا وسیع، نمونه ی مثبتی در بین موارد آزمایش شده، وجود نداشت. به عنوان مثال آنتی بادی ضد EIA در هیچ یک از مطالعاتی که در سویس و ترکیه انجام شده است یافت نشده است (۸، ۹). نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات قدردان مشهدی و همکاران (۱۳۸۹) در اهواز به روش سرولوژی آگار ژل ایمونودیفوژن (۲) و حسن پور و همکاران (۱۳۸۹) در تبریز به روش الایزا همخوانی دارد (۱). چون به رغم عدم وجود نمونه های متعلق به این مناطق، در این مطالعه نیز در میان نمونه های ارزیابی شده هیچ نمونه مثبتی به دست نیامد.

تنها در بین مطالعات محدودی که در ایران انجام گرفته و در منابع منتشر شده است، Hazrati و همکاران (۱۹۷۸) و ممتاز و همکاران (۱۳۸۸) میزان آلودگی سرمی به این ویروس را به ترتیب ۲/۵۴ و ۲/۹ درصد گزارش کردند (۳، ۵). این اختلاف می تواند به علت تفاوت در جمعیت مورد مطالعه یا زمان متفاوت و یا ابتلای محدود در یک گله باشد.



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز کنترل مثبت ویروس کم خونی عفونی اسب با پرایمرهای داخلی. M: مارکر۱۰۰ جفت بازی، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت

Archive of SID

نتیجــه ی حاضــر خوشبختانه می تواند بیانگر ایــن مسئله باشد که عفونــت با این ویروس در نمونه های متعلق به مناطق مورد بررسی وجود ندارد که این مورد به ویژه در تجارت و نقل و انتقال دام ها نکته ی مثبتی بــرای پرورش صنعت اسب داری کشــور محسوب می شود. در عین حال باید مراقب بود و با انجام آزمایش های مستمر وضعیت را پایش و از وقوع احتمالــی بیماری پیشگیــری کرد. در این زمینه سیاستــی پیشگیرانه با تلاش توام و هماهنگ مسئولین دامپزشکی و دامداران مورد نیاز است.

منابع مورد استفاده

۱- حسن پور، ع.، رضایی صابر، ا.، موسی خانی، ف.، (۱۳۸۹) بررسی سرولوژیکی میزان آلودگی به ویروس کم‌خونی عفونی اسب‌ها در منطقه تبریز، مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۴، ۲: ۸۳۷-۸۴۱

۲- قــدردان مشهــدی، ع.، صیفی آبادی شاپوری، م.، یونســی، ا. (۱۳۸۹) بررسی سرولوژیــک کم خونی عفونی اسب در اهواز. مجلــه تحقیقات دامپزشکی، ۶۵، ۳: ۲۴۵-۲۴۶.

۳- ممتاز، ح.، نجات، ش.، پورتقی، ه. (۱۳۸۸) استفاده از روش PCR در تشخیص ویروس کم خونی عفونی اسب در ایران. مجله علوم دامپزشکی ایران. ۳:۸۰۵-۸۱۰

4- Cook, S.J., Cook, R.F., Montelaro, R.C., Issel, C.J. (2001) Differential responses of *Equus caballus* and Equus asinus to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus, *Veterinary Microbiology*. 79, 93–109.

5- Hazrati, A., Kargar Moakhar, R., Mahinpoor, M., Dayhim, F. (1987) Serological survey on the presence and distribution of Equine Infectious Anemia in Iran. *Archive of Razi Institude.* 30:17-23.

6- Howe, L., Leroux, C., Issel, C.J., Montelaro, R.C. (2002) Equine infectious anemia virus envelope evolution *in vivo* during persistant infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype. *Journal of Virology.* 76(21): 10588- 10597.

7- Issel, C.J. and Coggins, L. (1979) Equine infectious anemia: current knowledge, *Journal of the American Veterinary Medical Association cover*. 174 ,727–733.

8- Kaiser, A., Meier, H.P., Doherr, M.G., Perler, L., Zanoni, R., Gerber, V. (2009) Serological and clinical proof of freedom from Equine Infectious Anemia (EIA) in imported and domestic horses in Switzerland, *Schweiz Arch Tierheilkd.* 151(4):165-70.

9- Kirmizigul, A. H., Yildirim, Y., Gokce, E., Ataseven, V.S. (2009) Serologic Evaluation of the Equine Infectious Anaemia in Kars and Ardahan–Turkey, *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi,* 15, 77–80

10- Langemeier, J.L., Cook, R.F., Rushlow, K.E., Montelaro, R.C., Issel, C.J. (1996) Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and Long-term inapparent carrier animals by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 34(6) 1481-1487.

11- Leroux, C., Craigo, J.K., Issel, C.J., Montelaro, R.C. (2001) .Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies, *Journal of Virology*. 75 ,4570–4583.

12- Lew, A.M., Thomas, M.L., Huntington, P.J. (1993) A comparison of ELISA, Fast-ELISA, and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anemia virus, *Veterinary Microbiology,* 34, 1–5

13- Nagarajan, M.M. and Simard, C. (2001) Detection of horses infected naturally with equine infectious anaemia virus by nested polymerase chain reaction, *Journal of Virological Methods*, 94, 97–109

14- Pearson, J.E. and Knowles, R.C. (1984) Standardization of the equine infectious anaemia immunodiffusion test and its application to the control of the disease in the United States, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184, 298–301

15- Sellon, D.C., Fuller, F.J., McGuire, T.C. (1994) The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus, *Virus Research*. 32, 111–138.

16- Spyrou, V., Papanastassopoulou, M., Psychas, V., Billinis, C., Koumbati, M., Vlemmas, J., Koptopoulos, G. (2003) Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies, *Veterinary Microbiology*. 95, 49–59.

Archive of SID

www.SID.ir