

بررسی فراوانی حامل‌های ویروس تب برفکی در گوسفندان ذبحی کشتارگاه صنعتی مشهد با استفاده از RT-PCR

سعید زیبایی^{۱*} صمد رضائی^۲ محمد رشتی باف^۳

(۱) موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، مشهد-ایران
 (۲) دانش آموخته گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد، مشهد-ایران
 (۳) بخش بررسی‌ها، اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی، مشهد-ایران
 (دریافت مقاله: ۱۴ آبان ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۹ دی ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری تب برفکی در ایران بومی می‌باشد. روش‌های تشخیصی مولکولی توان بالقوه مهمی برای تشخیص دام‌هایی که دارای عفونت پنهان بوده و یا حامل می‌باشند، ارائه نموده است. **هدف:** بررسی فراوانی حامل‌های ویروس تب برفکی در گوسفندان ذبحی کشتارگاه صنعتی مشهد با استفاده از RT-PCR. **روش کار:** پس از جداسازی ۹۴ نمونه از لوزه گوسفندان، واکنش RT-PCR برای تشخیص تب برفکی و تعیین سروتیپ ویروس تب برفکی انجام گردید و در انتها تعیین توالی اسید نوکلئیک انجام شد. **نتایج:** نتایج به دست آمده از تشخیص ویروس تب برفکی نشان داد ۲۳ نمونه (۲۴/۵٪) از نظر وجود RNA ویروس تب برفکی مثبت می‌باشند که از این تعداد ۲۰ نمونه تیپ O تشخیص داده شد و ۳ نمونه از نمونه‌های مثبت از نظر تب برفکی به تعیین تیپ با پرایمرهای اختصاصی جواب ندادند، همچنین نتایج حاصل تعیین توالی اسید نوکلئیک ناحیه ID ژنوم ویروس نشان داد که ویروس تب برفکی حامل گوسفندی (O/IRN/100/2010Sheep) دارای ۹۲/۰۲٪ تشابه با ویروس O/IRN/67/2001-2005 و ۸۸/۴۲٪ تشابه با ویروس O/IRN/15/2004-2008 می‌باشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** مطالعه حاضر نشان داد که در صد گوسفندان حاملین ویروس تب برفکی در کشتارگاه مشهد قابل توجه می‌باشد. توصیه می‌گردد تا از برآورد دوره‌ای حاملین در گاو و نشخوارکنندگان کوچک بعنوان آگاهی دهنده از برنامه‌های کنترلی در منطقه استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: ویروس تب برفکی، شناسایی مولکولی، حاملین گوسفندی

حیواناتی که بتوان ۲۸ روز پس از عفونت، ویروس را از مایع دهانی - حلقی (OP-Esophageal-Pharyngeal Fluid) آنها شناسایی نمود، حامل گفته می‌شود (۱). طول دوره حامل بودن متنوع بوده و به گونه میزبان، وضعیت ایمنی جمعیت حساس و سویه ویروس بستگی دارد. این زمان را در گاو ۲/۵ سال، در گوسفند ۹ ماه، در بز ۴ ماه و در گاو میش آفریقائی بیش از ۵ سال می‌دانند.

بنظر می‌رسد در دام‌های واکنسینه مواجه شده با ویروس شکل‌گیری حامل، متداول تر باشد (۲). آزمایشگاه مرجع جهانی تب برفکی (World Reference Laboratory (WRL) در پاسخ به استعلام جامعه سلطنتی انگلستان در مورد حامل‌های تب برفکی چنین عنوان می‌کند. "وضعیت حامل‌ها سد اصلی برای استفاده از واکنسیناسیون علیه تب برفکی محسوب می‌گردد". این موضوع اثرات مهمی بر تجارت بین‌المللی داشته و منجر به اعمال محدودیت‌هایی شده است (۵). در مناطقی نظیر ایران که بیماری بومی است شکل‌گیری حیوان حامل بیشتر است (۲۵) روش مرسوم شناسائی نشخوارکنندگان حامل جداسازی ویروس از نمونه مایع مری - حلقی روی کشت سلولی می‌باشد. روش‌های تشخیصی مولکولی بدلیل شناسایی تعداد اندکی از ژنوم ویروسی، توانایی بالقوه‌ای مهمی برای تشخیص دام‌هایی که دارای عفونت پنهان بوده و یا حامل می‌باشند، ارائه نموده است. نظریه اینکه گوسفند در برخی از موارد بدنبال عفونت با ویروس تب برفکی علائم واضحی از بیماری را نشان نمی‌دهد

مقدمه

عامل بیماری ویروسی است از جنس آفتوویروس (Aphthovirus) و از خانواده پیکورناویریده (Picornaviridae) که دارای ۷ سروتیپ (C، O، A، Asia 1، SAT1، SAT2، SAT3)؛ تعدادی زیادی تحت تیپ می‌باشد. رهایی از بیماری پس از عفونت با یک سروتیپ، سبب ایجاد مقاومت در برابر سایر سروتیپ‌ها نمی‌گردد (۴، ۳۲). بیماری تب برفکی در خاورمیانه از جمله ایران بومی می‌باشد. کنترل بیماری در چنین کشورهایی کاریست بسیار سخت و پرهزینه و اساس کنترل بر پایه واکنسیناسیون جمعیت گاو استوار است. تب برفکی از سال ۱۳۳۰ در کشور گزارش شده و در سال ۱۳۳۴ تیپ O ویروس تب برفکی و ۱۳۳۹ تیپ A و Asia 1 برای اولین بار جدا گردید. از آن زمان به بعد هر از چندگاه کشور درگیر همه‌گیری‌های ناشی از این سروتیپ‌ها بوده است در برخی از موارد نظیر همه‌گیری‌های سال ۱۳۶۶ (تیپ A)، سال ۱۳۸۹ وقوع نوع جدید (سرو تیپ O) شاهد مرگ و میر غیر معمول ناشی از بیماری می‌باشیم و اخیراً نیز کشور با تحت تیپ O2013 مواجه می‌باشد (۲۶، ۳۱) یکی از جنبه‌های مهم بیماری تب برفکی، عفونت پایدار می‌باشد که ممکن است پس از بهبودی از شکل بالینی بیماری و یا بدنبال مواجهه با ویروس زنده در نشخوارکنندگان واکنسینه ایجاد گردد (۷، ۱۲، ۱۳). طبق تعریف به



از پرایمرهای تعیین تیپ نام برده شده در جدول ۱ بعنوان پرایمرهای رفت استفاده گردید. همچنین برای تایید نتایج حاصل از پرایمر اختصاصی NK72 بعنوان پرایمر برگشت و از پرایمر O1C272 بعنوان پرایمرهای رفت استفاده شد. مراحل سیکل حرارتی به ترتیب طبق آنچه برای پرایمرهای عمومی بکار رفته بود به استثنای مراحل آنیلینگ که برای پرایمرهای تعیین تیپ سرو تیپ O، C، ۵۷^o بمدت یک دقیقه و برای تعیین تیپ سرو تیپ A، C، ۶۰^o بمدت یک دقیقه و برای تیپ سرو تیپ Asia1، C، ۵۸^o بمدت یک دقیقه تعیین گردید. همچنین بمنظور تایید سرو تیپ O از پرایمرهای NK72 و O1C272 استفاده شد که دمای آنیلینگ برای استفاده از این پرایمرها C، ۶۰^o بمدت یک دقیقه می باشد و از سایر دماها و سیکل های حرارتی نظیر آنچه برای تشخیص ویروس تب برفکی آورده شده است استفاده شد (۵، ۱۴، ۲۴، ۳۲).

خالص سازی محصول PCR: با استفاده از کیت (Germany) High Pure PCR Product Purification (Roche Molecular Biochemical, انجام شد.

تعیین توالی اسید نوکلئیک: پس از خالص سازی ۴ مورد محصول PCR تعیین توالی نوکلئوتیدی توسط شرکت MWG (MWG company Germany) انجام گردید.

بیوانفورماتیک و آنالیز داده ها: میزان همولوژی توالی اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه منطقه VP1 بدست آمده با توالی تعدادی از ویروس های ایران ثبت شده در بانک جهانی ژن (Gene bank) در پایگاه NCBI با استفاده از نرم افزار 5.5 Main workebench CLC و ابزار BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل توالی ها با ۱۰۰۰ تکرار و باروش neighbor-joining توسط نرم افزار MEGA4 و هم ردیفی چندگانه توسط نرم افزار 5.5 Main workebench CLC صورت پذیرفت. بررسی تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از رویه test Tajimas توسط نرم افزار MEGA4 انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از استخراج RNA ویروس: نتایج نشان داد که متوسط میزان RNA استخراج شده ۲۴۰ng/μL می باشد.

نتایج حاصل از تشخیص ویروس تب برفکی با استفاده از پرایمرهای عمومی P32 و P33: نتایج نشان داد که ۲۳ مورد مثبت بوده (۲۴/۵٪) و ۷۱ مورد منفی می باشند (۷۵/۵٪). برای تمامی نمونه ها آزمایش تعیین تیپ انجام گردید (تصویر ۱).

نتایج حاصل از تعیین تیپ نمونه ها: نتایج حاصل از تعیین تیپ با پرایمرهای اختصاصی نشان داد که در ۲۰ مورد (۸۹/۹٪) از ۲۳ نمونه تعیین تیپ انجام گرفت که تمامی آنها تیپ O می باشند. تنها در ۳ نمونه از نمونه های مثبت با پرایمرهای اختصاصی تعیین تیپ انجام نشد (تصویر ۲). همچنین نتایج حاصل از تعیین تیپ با استفاده از پرایمرهای

توانایی ایجاد شکل پایدار بیماری در این حیوان مهم می باشد. همچنین باید در نظر داشت که برنامه واکسیناسیون منظمی برای جمعیت گوسفندی کشور طراحی نشده است لذا بررسی حیوان حامل در این جمعیت از دیدگاه اتخاذ استراتژی کنترل تب برفکی حائز اهمیت می باشد.

مواد و روش کار

نمونه گیری و آماده سازی نمونه: طی ۶ ماه تعداد ۹۴ نمونه لوزه از گوسفندان ذبحی کشتارگاه صنعتی مشهد به شکل کاملاً تصادفی اخذ گردید. تعداد نمونه با احتمال شیوع ۴۰ درصدی گوسفندان حامل و با سطح اطمینان ۹۵٪ برآورد شده است (۳). نمونه ها با استفاده از پنس و قیچی کاملاً استریل گرفته و پس از انتقال به ظروف حمل نمونه حاوی بافر فسفات آماده شده با آب مقطر فاقد RNase به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آزمایش در فریزر C، ۷۰^o نگهداری شد. جهت آماده سازی نمونه ابتدا ۵g از نمونه لوزه را در هاون چینی با بافر فسفات سرد شستشو داده و سپس با ۴/۵mL با آب مقطر فاقد RNase هموژن گردید. تعلیق به دست آمده بلافاصله مورد آزمایش قرار گرفت و یادر فریزر C، ۷۰^o تا زمان آزمایش نگهداری گردید.

استخراج RNA: جهت استخراج RNA از کیت (Germany) High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Molecular Biochemical) - استفاده شد. مراحل استخراج طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. سنجش میزان RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ 1000-ND ۷3.0.1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش رونوشت برداری معکوس: برای تهیه cDNA از کیت RT PreMix[®] (Bioneer, Korea) استفاده گردید. روش کار طبق دستورالعمل کیت برای حجم نهایی ۲۰μL انجام گرفت. اجرای سیکل حرارتی برای تهیه cDNA از قرار C، ۴۲^o بمدت ۵۰ دقیقه، C، ۴۸^o به مدت ۱۰ دقیقه، C، ۷۰^o بمدت ۱۰ دقیقه، C، ۴۰^o بمدت ۵ دقیقه می باشد. در این مرحله از پرایمرهای برگشتی P33 و نیز NK72 برای تهیه cDNA استفاده گردید (۵، ۱۴، ۲۴، ۳۲).

واکنش PCR: واکنش PCR برای تشخیص تب برفکی و تعیین سرو تیپ ویروس تب برفکی انجام گردید. بدین منظور از کیت PCR PreMix[®] (Bioneer, Korea) استفاده شد. روش کار طبق دستورالعمل کیت برای حجم نهایی ۲۰μL تنظیم گردید. برای تشخیص ویروس تب برفکی از پرایمرهای عمومی P33 بعنوان پرایمر برگشت و از P32 بعنوان پرایمر رفت استفاده شد. مراحل سیکل حرارتی به ترتیب C، ۹۴^o بمدت ۴ دقیقه (یک سیکل)، C، ۹۴^o بمدت یک دقیقه به همراه C، ۵۶^o بمدت یک دقیقه و C، ۷۲^o بمدت دو دقیقه (۳۰ سیکل)، سپس C، ۷۲^o بمدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) می باشد برای تعیین تیپ ویروس تب برفکی از پرایمرهای اختصاصی P33 بعنوان پرایمر برگشت و



جدول ۱. سکانس و موقعیت پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی و تعیین تیپ ویروس تب برفکی (۳۲، ۲۴، ۱۴، ۵).

Primer	Sequence 5'-3'	Virus	Location
P33	AGCTGTACCAGGGTTTGGC	FMDV	2B
P32	CAGATGCAGGAGGACATGTC	FMDV	2B
P38	GCTGCCTACCTCCTTCAA	FMDV-O	1D
P87	GTCATTGACCTCATGCAGACCCAC	FMDV-A	1D
P88	GTTATTGACCTCATGCAGACCCAC	FMDV-A	1D
P89	GTCATTGACCTCATGCACACCCAC	FMDV-A	1D
P90	GTCATTGACCTCATGCAGACTCAC	FMDV-A	1D
P91	GTCATTGACCTCATGCAAACCCAC	FMDV-A	1D
P92	GTCATTGACCTTATGCAGACTCAC	FMDV-A	1D
P74	GACACCACTCAGGACCGCCG	FMDV-Asia 1	1D
P75	GACACCAACCCAGGACCGCCG	FMDV-Asia 1	1D
P76	GACACCAACAAGACCGCCG	FMDV-Asia 1	1D
P77	GACACGACTCAGAACCGCCG	FMDV-Asia 1	1D
NK72	GAAGGGCCAGGGTTGGACTC	FMDV-O	2A
O1C272	TBGCRRGGNCTYGCCAGTTACTAC	FMDV-O	1D

شناسایی حاملین تب برفکی استفاده از نمونه مایع مری - حلقی روی کشت سلولی می باشد که این نمونه مخلوطی از موکوس و سلول های پوششی قسمت های قدامی مری و حلق بوده و توسط فنجانک پروبانگ برداشت می گردد (۳۰). اما حضور ویروس در ناحیه حلق حیوانات حامل می تواند به طور قابل ملاحظه ای متغیر باشد. جداسازی ویروس وابسته به زمان نمونه گیری و عواملی چون مهارت در نمونه گیری و روش نگهداری نمونه می باشد. آزمایش جدا سازی ویروس بر روی کشت سلولی یکی از معتبرترین آزمایش های تشخیصی است. اما این آزمایش نیز مشکلات خاص خود را دارد. اما با توجه به وقت گیر بودن و نیز هزینه بالا، انجام این آزمایش مشکل ساز بوده و همچنین نیاز به تجهیزات اختصاصی و تجربه زیاد دارد. با توجه به گزارش منتشر شده در آزمایشگاه رفرنس جهانی (WRL) ۲۰ تا ۳۰٪ از نمونه های مشکوک در کشت سلولی مثبت می شوند (۲۲). RT-PCR آزمایشی است که توانایی شناسایی مقادیر اندک ژنوم ویروسی موجود در نمونه را دارد و می تواند به عنوان جایگزین سریع و ساده برای آزمایش کشت سلولی مطرح شود (۲۲، ۲۱). Kitching و همکاران در سال ۲۰۰۲ و Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۳ اعتقاد دارند RNA شناسایی شده در RT-PCR الزاماً بیانگر وجود ویروس عفونی نیست و ممکن است ویروس غیر فعال بوده ولی اسید نوکلئیک آن حضور داشته باشد (۱۲، ۲۹). احتمالاً تنهایی از حیوانات حامل بوسیله یک آزمایش پروبانگ شناسایی خواهند شد. علاوه بر این روش نمونه گیری مشکل و زمان بر می باشد (۲۳، ۶). لذا در مطالعه حاضر از نمونه بافتی (بافت لوزه) استفاده گردید. در مطالعه حاضر که از تعداد ۹۴ نمونه که به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت تعداد ۲۳ نمونه (۲۴/۵٪) از نظر وجود RNA ویروس تب برفکی مثبت شدند. که از این تعداد ۲۰ نمونه تیپ O تشخیص داده شد و ۳ نمونه از نمونه های مثبت از نظر تب برفکی به تعیین تیپ با پرایمرهای اختصاصی جواب ندادند. Reid و همکاران در سال ۲۰۰۰ در آزمایش خود ۴۷ نمونه از ۵۲ نمونه مثبت تیپ های Asia 1، A

اختصاصی NK72 و O1C272 که در الکترو فورز قطعه ۱۰۸۵ جفت باز حاصل می نماید مورد تایید قرار گرفت (تصویر ۳).

نتایج حاصل تعیین توالی اسید نوکلئیک ناحیه ID: نتایج حاصل تعیین توالی اسید نوکلئیک ناحیه ID ژنوم ویروس تب برفکی (هر ۴ سکانس شده) حامل گوسفندی در استان خراسان رضوی مشابه بوده و نشان داد که ویروس تب برفکی حامل گوسفندی (O/IRN/100/2010Sheep) دارای بیشترین تشابه در ناحیه ID ژنوم با ویروس O/IRN/67/2001-2005 با ۹۲/۰۲٪ و کمترین تشابه با ویروس O/IRN/15/2004-2008 با ۸۸/۴۲٪ می باشد.

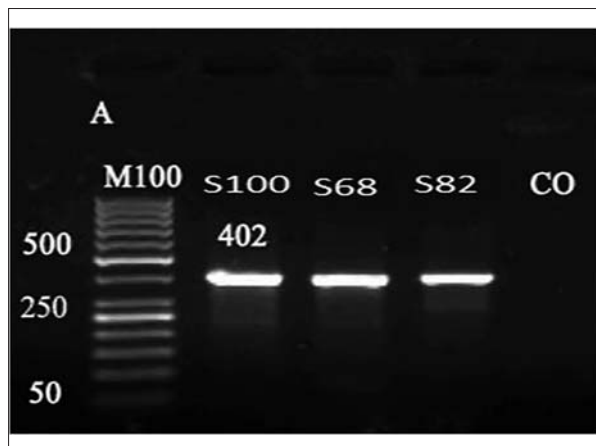
نتایج حاصل از تعیین توالی اسیدهای آمینه نشان داد که پنج جهش در نواحی اسیدهای آمینه ۱۳۳ (سیستئین تبدیل به آسپارات شده است)، ۱۴۰ (پرولین تبدیل به آرژنین شده است)، ۱۴۱ (والین تبدیل به ترئونین شده است)، ۱۷۴ (گلوتامات تبدیل به آسپارژین شده است)، ۱۹۷ (سرین تبدیل به آسپارات شده است) وجود دارد.

نتایج حاصل از رسم دندروگرام فیلوژنتیک: نتایج حاصل از رسم دندروگرام فیلوژنتیک نشان می دهد که ویروس تب برفکی جدا شده از حامل گوسفندی در استان خراسان رضوی ضمن اینکه تفاوت با ویروس های O/IRN/8/2004-2008، O/IRN/6/2004-2008، O/IRN/67/2001-2005، O/IRN/2/2003-2008-O/IRN/16/2003 دارد با ویروس های یاد شده در یک خط سرنوشتی قرار دارند و احتمالاً از یک ویروس منشأ گرفته اند (تصویر ۵).

بحث

تب برفکی از جمله اقتصادی ترین بیماریهای دامی محسوب می گردد. عفونت پایدار غیر آشکار یکی از پیامدهای متداول اشکال در مانگاهی و تحت در مانگاهی عفونت با ویروس تب برفکی در نشخوارکنندگان می باشد که وضعیت حامل خوانده می شود (۲۳). روش





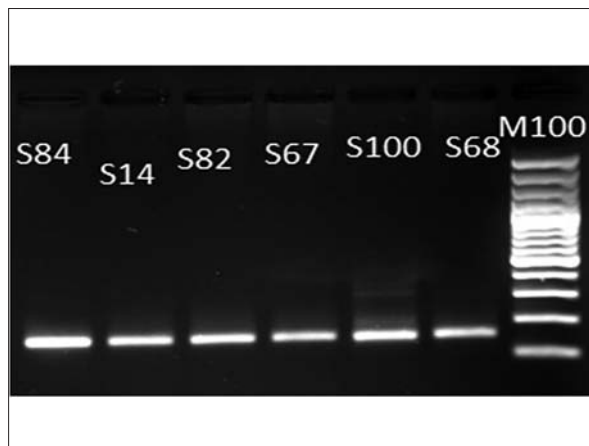
تصویر ۲. الکتروفورز نتایج حاصل از تعیین تیپ ویروس تب برفکی با استفاده از پرایمرهای M100.P33,P38 مارکر، 100bp شماره s100 کنترل مثبت - شماره های s68,s67,s82 نمونه های مثبت تیپ O با باند 402 bp.

مطالعه حاضر در بنگلادش، انجام گرفت تمام نمونه های جدا شده از حاملین گاوی تب برفکی تیپ O گزارش گردید (۱۴). در مطالعه حاضر بدلیل افزایش سطح اطمینان جهت تعیین تیپ، از تمامی پرایمرهای که برای تعیین تیپ ویروس تب برفکی مورد استفاده قرار می گیرد (جدول ۱)، استفاده گردید. اعتقاد بر این است که لوزه بهترین منبع برای بررسی حاملین گوسفندی تب برفکی می باشد (۲۴) به طور کلی میزان شیوع حامل هادر جمعیت یک گونه دامی خاص به نژاد، میزان وقوع بیماری (یا عفونت) و وضعیت ایمنی آن جمعیت بستگی دارد (۱۲،۱۳).

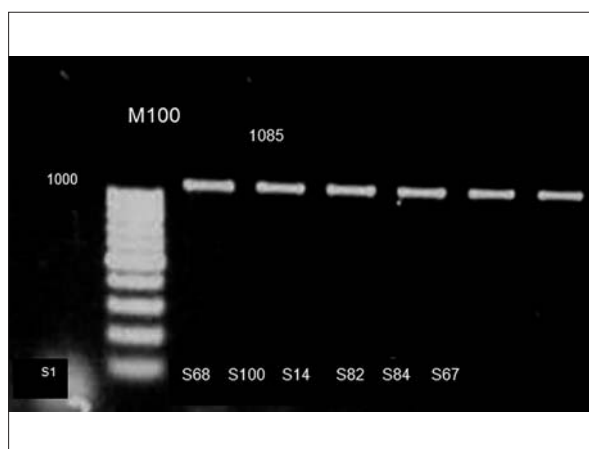
گوسفند و بز بویژه می توانند در اپیدمیولوژی تب برفکی خطرناک باشند زیرا معمولاً فاقد یا دارای نشانه های بالینی بسیار خفیف می باشند که حتی می تواند از چشم دامپزشکان با تجربه نیز دور بماند و ویروس به راحتی منتشر شود. از اینرو نشخوارکنندگان کوچک اهلی به عنوان یکی از عوامل تزیاید و انتشار ویروس تب برفکی در محیط محسوب می گردند (۱۲،۱۳).

ویروس تب برفکی سرو تیپ O بیشترین ویروسی است که از نمونه های ارسالی به آزمایشگاه رفرنس جهانی (WRL) جدا می شود. این سرو تیپ بیشترین شیوع را در خاور میانه دارد. در دهه های اخیر استفاده از روش های شناسایی مولکولی جایگزین روش جدا سازی ویروس شده است و نشان داده شده که روش RT-PCR حساس تر از روش استاندارد جدا سازی ویروس است و می تواند برای تشخیص سریع ویروس تب برفکی در دوره عفونت پایدار مورد استفاده قرار گیرد (۱۶).

Murphy Prato و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که RT-PCR بسیار حساس تر از روش استاندارد جدا سازی ویروس است و می تواند برای تشخیص سریع ویروس تب برفکی در بافت های گاوهای آلوده در دوره عفونت پایدار با این ویروس مورد استفاده قرار گیرد (۱۶). در مطالعه Ghorashi و همکاران در سال ۲۰۰۲ که بر روی نمونه های بافتی از موارد



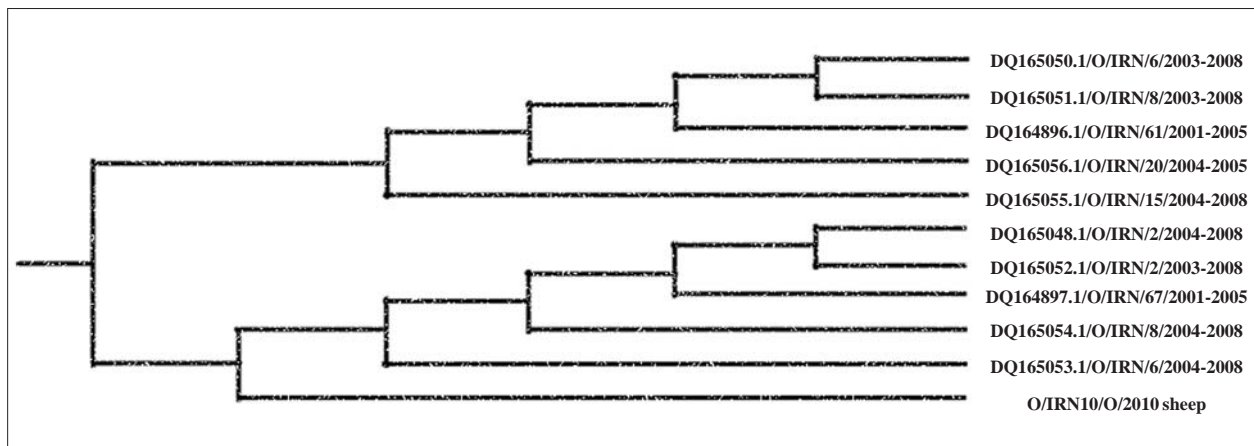
تصویر ۱. الکتروفورز نتایج حاصل از تشخیص ویروس تب برفکی M100 مارکر - 100bp شماره s68 کنترل مثبت - شماره های s100,s67,s82,s14,s84 نمونه های مثبت با باند 131 bp.



تصویر ۳. الکتروفورز نتایج حاصل از تعیین تیپ ویروس تب برفکی با استفاده از پرایمرهای NK72 و O1C272 - M100 مارکر (100 bp)، شماره s100 کنترل مثبت - شماره های s84, s68,s67,s82، نمونه های مثبت تیپ O با باند 1085 bp.

O را توسط پرایمرهای Universal (1F/1R) تشخیص دادند (۲۱). در مطالعه حاضر نیز علت اینکه ۳ نمونه از نمونه های مثبت به تعیین تیپ جواب ندادند را حساسیت کمتر پرایمرهای اختصاصی نسبت به پرایمرهای Universal می دانیم. فراوانی گسترده و غالب سرو تیپ O در نمونه های پژوهش حاضر دور از انتظار نیست زیرا شایع ترین سرو تیپ در خاور میانه سرو تیپ O است و در بیش از ۹۰٪ نمونه های ارسالی به (WRL) از خاور میانه تیپ O گزارش شده است (۲۰،۳۲). میزان و تیپ حاملین ویروس تب برفکی نشان دهنده ویروسی است که در ماه های گذشته در منطقه شیوع یافته است. در این مطالعه از آنجائیکه در ماه های قبل از نمونه گیری، طبق گزارش اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی از موارد کلینیکی سرو تیپ O جدا شده است لذا اینکه تنها این سوبه از حاملین گوسفندی تعیین تیپ شده، مورد انتظار می باشد. در مطالعه ای که توسط Loth و همکاران در سال ۲۰۰۹ تقریباً هم زمان با نمونه گیری در





تصویر ۴. رسم دندروگرام فیلوژنتیک اسیدهای نوکلئیک ویروس تب برفکی جدا شده از حامل گوسفندی در استان خراسان رضوی با استفاده از نرم افزار CLC.

نمونه‌های اپیتلیوم زبان استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین تیپ مشکل تر می‌باشد که دلیل این امر با توجه به میزان کم حضور ویروس و نسبت حضور ویروس به سلول بافتی بسیار روشن می‌باشد. تمامی ویروس‌های موارد مثبت در این بررسی، تیپ O ویروس تب برفکی تعیین تیپ شدند که نظر به رابطه مهم ماندگاری تیپ O ویروس تب برفکی و گوسفند و اینکه بیش از ۹۰٪ نمونه‌های مثبت گوسفندی تیپ O می‌باشند این موضوع دور از انتظار نمی‌تواند باشد (۱۰). در تحقیقی که Zibaei و همکاران در سال ۲۰۰۷ در استان خراسان رضوی انجام دادند بیش از ۷۷٪ از نمونه‌های تب برفکی که طی ۲۳ ماه از کانون‌های بیماری در استان شناسایی شده است را تیپ O تشخیص دادند (۳۳). Rashtibaf و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که ۳۷/۶٪ گاوهای به ظاهر سالم کشتار شده در کشتارگاه مشهد به روش RT-PCR حامل ویروس تب برفکی می‌باشند (۱۹). نتیجه تحقیق حاضر نشان دهنده اهمیت گوسفندان حامل ویروس تب برفکی در ایران و استان خراسان رضوی می‌باشد. Hughes و همکاران در سال ۲۰۰۲ اعتقاد دارند که بین ماندگاری تیپ O در گوسفند و شیوع تب برفکی در گاو رابطه وجود دارد (۱۱). این نکته که گوسفند سبب تسهیل ماندگاری ویروس تب برفکی می‌گردد مورد توافق می‌باشد (۲۵). نکته قابل توجه این است که OIE تأکید بر انجام واکسیناسیون در جمعیت گاو دارد و معتقد است که با کنترل بیماری در گاو بیماری در جمعیت گوسفندی خود بخود کنترل می‌گردد (۱۷). اما با توجه به نسبت جمعیت گوسفندی به جمعیت گاو در کشور و بعلاوه فرهنگ دامداری در روستاها و مناطق عشایری که هنوز گوسفند در کنار گاو نگهداری می‌شود، برای کنترل بیماری تب برفکی به نظر می‌رسد باید برای جمعیت گوسفندی و واکسیناسیون آنها اهمیت بیشتری قائل شد. در این مسیر بررسی جامع و دوره‌ای جمعیت حاملین گوسفندی می‌تواند کمکی برای تدوین استراتژی کنترل بیماری تب برفکی محسوب گردد.

بالینی بیماری صورت پذیرفت، حساسیت روش RT-PCR بیش از روش‌های جداسازی ویروس، ELISA و CFT عنوان گردید (۸). در این تحقیق مشخص شد که ۲۴/۵٪ از نمونه‌ها مورد بررسی حامل ویروس تب برفکی می‌باشند. در مطالعه‌ای که با روش جداسازی ویروس در بخش آسیایی کشور ترکیه انجام گرفته ۲۰٪ از گوسفندان را حامل ویروس تب برفکی تشخیص دادند (۴) همچنین در مطالعه‌ای دیگر که در ترکیه با روش جداسازی ویروس انجام شده ۱۸/۴٪ گاوها و ۱۶/۸٪ گوسفندان حامل ویروس تب برفکی تشخیص داده شدند (۹). در تحقیق دیگری Alexanderson و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده شد که در شرایط تحت کنترل ۵۰٪ گوسفندانی که در معرض ویروس قرار گرفته بودند به شکل حامل درآمدند (۲) بررسی انجام گرفته توسط Bahari و همکاران در سال ۲۰۰۷ در کشتارگاه زیاران ۳۴/۶٪ از گاوهای مورد مطالعه با روش nested PCR حامل ویروس تب برفکی تشخیص داده شد (۳). Rasooli و همکاران در سال ۲۰۱۳ دو نمونه از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی اخذ شده از گاوهای کشتار شده در کشتارگاه اهواز را حامل ویروس تب برفکی تشخیص داد و هر دو نمونه را تیپ A تعیین تیپ نمود (۲۰). با توجه به حساسیت استفاده از RT-PCR و نتایج حاصل از این تحقیق این روش را برای بررسی اپیدمیولوژیک حاملین تب برفکی می‌توان توصیه نمود. تحقیق حاضر اولین تحقیق در نوع خود برای بررسی حاملین گوسفندی در ایران می‌باشد. اگر چنانچه نقش حیوانات دارای عفونت پایدار (حاملین) در اپیدمیولوژی بیماری مهم بدانیم می‌توان نتیجه گرفت که نقش حاملین گوسفندی در ایران و بخصوص در استان خراسان رضوی که از جمعیت قابل توجه گوسفندی برخوردار است بسیار با اهمیت می‌باشد. در این بررسی از پرایمرهای عمومی (P32;P33) برای تشخیص تب برفکی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج بیانگر این است که پرایمرهای عمومی از حساسیت مناسبی جهت تشخیص برخوردار هستند و جهت تعیین تیپ از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده گردید. در مقایسه



References

- Alexanderson, S., Zhang, Z., Donaldson, A.I., Garland, A.J.M. (2003) The Pathogenesis and diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *J Comp Pathol.* 129: 1-36.
- Alexanderson, S., Zhang, Z., Donaldson, A.I. (2002) Aspect of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals, the carrier problem. *Microbes Infect.* 4: 1099-1110.
- Bahari, A., Taghipour-Bazargani, T., Marquardt, O., Ghorashi, S.A., Bokaie, S. (2007) Application of nested-PCR for detection of foot and- mouth disease viral sequences in tonsil of slaughtered cattle with clinically normal appearance in Iran. *Vet Arh.* 77: 299-306.
- Blancou, J. (2002) History of control of footand-mouth disease. *Comp Immunol Microb.* 25: 283-293.
- Callens, M., De Clercq, K., Gruia, M., Danes, M. (1998) Detection of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction and virus isolation in contact sheep without clinical signs of foot-and-mouth disease. *Vet Q.* 20: 37- 40.
- Domingo, E. (1998) Quasispecies and implications for virus persistence and escape. *Clin Diagn Virol.* 10: 97-101.
- Fenner, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J., White, D.O. (1993) *Veterinary Virology*, (2nd ed.) Academic Press, INC, California, USA.
- Ghorashi, S.A., Hagian, T., Daliri, M., Banuei, M.M., Alvand, A.R. (2002) Detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples by RT-PCR. *Pajouhesh-Va-sazandegi (In Persian).* 53: 10-12.
- Gurhan, S.I., Gurhan, B., Osturkmen, A., Aynagoz, G., Candas, A., Kizil S. (1993) Establishment of the prevalence of persistently infected cattle and sheep in Anatolia with FMDV. *J Etlik Vet Microbiol.* 7: 52-59.
- Hedger, R.S. (1968) The isolation and characterization of foot-and-mouth disease from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J Hyg (Lond).* 66: 27-36.
- Hughes, G.J., Mioulet, V., Haydon, D.T., Kitching, R,

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی و دانشگاه پیام نور مشهد قدردانی می‌شود. همچنین مراتب قدردانی صمیمانه از سرکار خانم مریم ترابی و آقای دکتر عبدالرئوف شوکانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند، اعلام می‌گردد.

- P., Donaldson, A.I., Woolhouse, M.E.J. (2002) Serial passage of foot-and-mouth disease virus in sheep reveals declining levels of viraemia over time. *J Gen Virol.* 83: 1907-1914.
- Kitching, R.P. (2002) Identification of foot and-mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals. *Rev Sci Tech Oie.* 21: 531- 538.
 - Kitching, R.P. (2002) Clinical variation in foot and mouth disease: cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 21: 499-504.
 - Knowles, N.J., Samuel, A.R. (1998) *RT-PCR and Sequencing Protocols for the Molecular Epidemiology of Exotic Virus Diseases of Animals.* (1st ed.). Institute for Animal Health. Pirbright, UK.
 - Loth, L., Osmani, M.G., Kalam, M.A., Chakraborty, R.K., Wadworth, J., Knowles, N.J., Hammond, J.M., Benigno, C. (2011) Molecular characterization of Foot- and - mouth disease virus: implication for disease control in Bangladesh. *Transbound Emerg Dis.* 58: 240-246.
 - Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. (1999) *Veterinary Virology.* (3rd ed.) Academic Press. San Diego, California, USA.
 - OIE. (2002) *Foot and Mouth Disease: Facing the New Dilemmas; volume 21.* (11th ed.) OIE, Paris, France.
 - Prato Murphy, M.L., Meyer, R.F., Mebus, C., Schudel, A.A., Rodriguez, M. (1994) Analysis of sites of foot-and-mouth disease virus persistence in carrier cattle via the polymerase chain reaction. *Arch Virol.* 136: 299-307.
 - Rashtibaf, M., Sharifi, K., Zibaee, S., Dehghani, H. (2012) A survey on the frequency of foot-and-mouth



- disease virus carriers in cattle in north-east of Iran by RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 59: 482-489.
20. Rasooli, A., Seyfi abad Shapouri, M.R., Haji Hajikolaie, M.R., Komeilian, A. (2013) Search for FMD virus carrying buffaloes slaughtered in Ahvaz abattoir. *Ir Vet J.* 8: 28-35.
 21. Reid, S.M., Forsyth, M.A., Hutchings, G.H., Ferriis, N.P. (1998) Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot- and- mouth disease. *J Virol Method.* 70: 213-217.
 22. Reid, S.M., Ferris, N.P., Hutchings, G.H., Samuel, A.R., Knowles, N.J. (2000) Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Virol Method.* 89: 167-176.
 23. Reid, S.M., Ferris, N.P., Hutching, G.H., De Clerq, K., Newman, B.J., Knowles, N.J., Samuel, A.R. (2001) Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: use of phylogenetic data to evaluate primers for typing of viral RNA in clinical samples. *Arch Virol.* 146: 2421-2434.
 24. Salt, J.S. (1993) The carrier satate in foot and mouth disease-An immunological review. *Br Vet J.* 149: 207-223.
 25. Samuel, A.R., Knowles, N.J., Kitching, R.P. (1988). Serological and biochemical analysis of some recent type A foot-and-mouth disease virus from the middle East. *Epidemiol Infect.* 101: 577-590.
 26. Sutmoller, P., Barteling, S.S., Olascoaga, R.C., Sumption, K.J. (2003) Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 91: 101-144.
 27. Taleb shoostari, A. (1996) FMD and its status in IR Iran. *Pajouhesh-Va-sazandegi (In Persian).* 29: 82-85.
 28. Vangrysterre, W., De Clerq, K. (1996) Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch Virol.* 141: 331-344.
 29. Vallat, B. (2002) Role of the international organization for animal health (Office International des Epizooties: OIE) in the control of foot-and-mouth disease. *Comp immunol microb.* 25: 383-392.
 30. Zhang, Z., Alexanderson, S. (2003) Detection of carrier cattle and sheep persistently infected with foot-and-mouth disease virus by a rapid real-time RT-PCR assay. *J Virol Method.* 111: 95-100.
 31. Zhang, Z.D., Kitching, R.P. (2001) The localization of persistent foot and mouth disease virus in the epithelial cells of the soft palate and pharynx. *J Comp Pathol.* 124: 89-94.
 32. Zibaei, S., Keivanfar, H., Rabbani, M., Hematzadeh, F., Kianizade, M., Fathi najafi, M. (2010) Comparative studyon 1d (vp1) region offoot and mouth disease virus (type astrain) amongdifferentisolates: khorasan razavi isolate and other iranian and neighboring countries isolates. *J Vet Res (University of Tehran).* 65: 199-202.
 33. Zibaei, S., Keivanfar, H., Rabbani, M., Kianizade, M., Hematzadeh, F., Bokaie, S. (2007) Identification of the foot and mouth disease foci from susceptible foci in khorasan razavi province. *J Vet Res (University of Tehran).* 62:151-155.



Evaluate the frequency of foot and mouth disease viral carriers in slaughtered sheep in Mashhad industrial abattoir using RT-PCR

Zibae, S.^{1*}, Rezaee, S.², Rashtibaf, M.³

¹Department of Veterinary Research and Biothecnology, Razi vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Mashhad-Iran

²Graduated from the Payam-e-Noor University of Mashhad, Department of Biochemistry, Mashhad-Iran

³Department of Investigation, khorasan-Razavi Provincial Veterinary Service, Mashhad-Iran

(Received 5 November 2014, Accepted 19 January 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Foot -and- mouth disease (FMD) is endemic in Iran. Molecular techniques for diagnosis of persistent infection or carrier animals have shown a potential ability to improve the detection of a low genome copy number in samples. **OBJECTIVES:** The purpose of this study is to evaluate the frequency of foot and mouth disease viral carriers in slaughtered sheep in Mashhad industrial abattoir using RT-PCR. **METHODS:** Samples were isolated from tonsil of 94 slaughtered sheep analyzed by RT-PCR experiment for the detection of FMD, identification of FMD virus serotypes and at the end nucleic acid sequencing were performed. **RESULTS:** The results showed that the 23 samples (24/5 percent) were positive for the presence of FMD virus RNA, of which 89.9% of cases are type O and 3 cases of FMD samples did not respond. The results of the 1D genome sequencing of the nucleic acid virus showed that FMD virus of sheep (O/IRN/100/2010Sheep), has 92/02% similarity with the virus (O/IRN/67/2001-2005) and 88/42% similarity with the virus (O/IRN/15/2004-2008). **CONCLUSIONS:** This study showed that the percentage of FMDV sheep carriers in Mashhad slaughterhouse was remarkable. Estimation of the frequency of carrier state in cattle and small ruminants is recommended as a monitor of control plan in the region.

Key words: FMD virus, molecular detection, sheep carriers

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Position and sequences of primers were used for the identification and typing of FMD virus (5,14,24,32).

Figure 1. Electrophoresis results detection of FMD virus, M100 (marker 100 bp), s68 (the positive control), s100, s67, s82, s14, s84 (Positive samples with 131bp bands).

Figure 2. Electrophoresis results Typing of FMD virus using P33, P38 primers, M100 (Marker 100 bp), s100 (The positive control), s68, s67, s82 (Positive samples, Type O with 402bp bands).

Figure 3. Electrophoresis results Typing of FMD virus using O1C272 and NK72 primers, M100 (Marker 100 bp), s100 (The positive control), s 84, s68, s67, s82 (Positive samples, Type O with 1085bp bands).

Figure 4. The results of the translated of 1D FMD virus genome isolated of sheep carriers from Khorasan-Razavi province (amino acid region of VP1 protein) and comparison with the number of FMD virus genes recorded in Iran and reported at gene bank using the CLC software.

*Corresponding author's email: s.zibae@mrazi.ac.ir, Tel: 051-38411009, Fax: 051-38420430

J. Vet. Res. 70, 1:7-14, 2015

