

## شناسایی کانونهای آلوده به ویروس تب برفکی در استان خراسان رضوی با روش‌های الیزا و RT-PCR

سعید زببائی\*<sup>۱</sup>، هادی کیوانفر<sup>۲</sup>، محمد ربانی<sup>۲</sup>، مهدی کیانی زاده<sup>۱</sup>، فرهید همت زاده<sup>۲</sup>، سعید بکائی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه مشهد، مشهد-ایران

<sup>۲</sup> گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

<sup>۳</sup> گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۲۲ فروردین ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۵ اسفند ماه ۱۳۸۵)

### چکیده

طی ۲۳ ماه (از اسفند ۸۲ تا دی ماه ۱۳۸۴)، تعداد ۸۳ نمونه اپیتلیوم زبان و دهان از دامهای مشکوک به بیماری تب برفکی در استان خراسان رضوی اخذ و بوسیله آزمایش‌های الیزا و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه تعداد ۱۲ کانون در سال ۸۳ و ۲۳ کانون در سال ۸۴ تایید گردید. بیشترین توزیع فراوانی کانون‌های بیماری در فصل بهار بوده است. برای آنالیز داده‌ها از آزمون‌های ضریب همبستگی پیرسون و مربع کای  $X^2$  استفاده شد و بین تراکم گوسفند و وجود بیماری در گاو رابطه‌ای مشاهده نشد. با توجه به افزایش تردد دام همچنین حساسیت بره‌های تولد یافته در زمستان نسبت به بیماری تب برفکی در بهار، بیماری در این فصل افزایش یافته است. نظر به جمعیت گوسفندی قابل توجه در کشور و نیز نقش گوسفند در ماندگاری ویروس تب برفکی، پوشش مناسب واکسن در جمعیت گوسفندی جهت کنترل بیماری تب برفکی مهم به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: بیماری تب برفکی، استان خراسان رضوی، الیزا، RP-PCR.

World Reference) معمول شده است (۱۶). در این بررسی سعی گردید ضمن پیدا نمودن کانون‌های بیماری تب برفکی در استان خراسان رضوی برای این بیماری الگوی فصلی پیدا نموده و بین وجود بیماری در گاو و تراکم جمعیت گوسفندی رابطه‌ای پیدا شود.

### مواد و روش‌ها

۱- ۱- نمونه‌گیری و آماده‌سازی نمونه‌ها: در طول ۲۳ ماه از اسفند ۱۳۸۲ لغایت دی ماه ۱۳۸۴ تعداد ۸۳ نمونه از ۸۳ کانون مشکوک از ۱۳ شهرستان استان خراسان رضوی - (بر اساس گزارش دامدار و مشاهده ضایعات لثه، زبان، و لایه بالایی سم در گاو یا گوسفند) - توسط دامپزشکان این استان اخذ (حداقل میزان باید یک سانتیمتر مربع باشد) و داخل بافر فسفات حاوی گلیسرول به آزمایشگاه اداره کل دامپزشکی ارسال و در فریژ منفی ۷۰<sup>۰</sup> نگهداری گردید (۱۲). سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه موسسه رازی مشهد آورده شده و جهت آماده‌سازی نمونه در ابتدا حدوداً ۵۰ میلی‌گرم از نمونه در هاون چینی توسط بافر فسفات سرد (pH=7.4) شستشو و سپس با ۴/۵ میلی لیتر از آب مقطر فاقد RNase هموژن گردید و پس از سانتریفوژ ۲ هزار دور به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد مایع رویی جهت استخراج RNA و انجام تست ELISA برداشت گردید (۱۲).

۲- ۱- استخراج RNA: RNA نمونه با استفاده از کیت استخراج RNA (TriPure -Version 3, Roche) بر مبنای روش Saachi and Chomczynsky و با استفاده از Thiocyanate-Phenol-Chloroform و Guandinium استخراج گردید. مراحل استخراج طبق دستورالعمل انجام گرفت (۱۲، ۱۷). سپس RNA استخراج شده توسط ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه

### مقدمه

بیماری تب برفکی بیماری حاد و بروسوی و فوق العاده مسری حیوانات زوج سم می‌باشد، که به عنوان یکی از جدی‌ترین خطرات صنعت دامپروری دنیا محسوب می‌شود. عامل بیماری ویروس RNA دار از خانواده پیکورنا و پیریده و از جنس آفتوویروس است که دارای هفت سروتیپ (Asia I, C, A, O) ماهیت ویروس که مستعد تغییرات آنتی‌ژنیک است تشخیص به موقع بیماری بسیار مهم می‌باشد. این امر به خصوص برای کشورهای پاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بیماری تب برفکی در لیست گروه A (بیماری‌های قابل گزارش فوری) دفتر مبارزه با بیماری‌های واکسیناسیون (OIE) قرار دارد (۱۱، ۱۳). بیماری تب برفکی در خاورمیانه و از جمله در کشور ما بومی است (۱۲). این بیماری از بدو تاسیس تشکیلات دامپزشکی در ایران شناخته شده است. تیپ O برای اولین بار در سال ۱۳۲۵ و تیپ‌های A در سال ۱۳۳۹ و Asia I در سال ۱۳۳۵ در ایران جدا گردید (۴). هم‌اکنون سروتیپ‌های O, A, Asia I تیپ‌هایی هستند که در حال گردش در کشور می‌باشند (۱۳). در حال حاضر نمونه‌های مشکوک به FMD از سراسر ایران توسط ادارات کل دامپزشکی استان‌ها جمع‌آوری شده و جهت تشخیص به مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی کشور و نیز برخی از نمونه‌ها به موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج ارسال می‌گردند. تشخیص اولیه ویروس تب برفکی در نمونه‌های مشکوک کلینیکی توسط آزمایش الیزا (Antigen detection) انجام می‌گیرد (۱۵، ۱۶). در سال‌های اخیر استفاده از RT-PCR برای تشخیص و تعیین تیپ ویروس تب برفکی در آزمایشگاه رفرنس جهانی (Laboratory for FMD (WRL), Pirbright



جدول ۱-۴- نام و مقادیر مواد مورد استفاده برای واکنش PCR.

نام ماده	میزان مورد استفاده
۱- بافر PCR (10x PCR Buffer)	۳/۵ میکرو لیتر
۲- کلرومنیزیم (50Mm) MgCl <sub>2</sub>	غلظت نهایی (2 mM)
۳- dNTP (10 mM dNTP Mix) ساخت شرکت Fermentas	غلظت نهایی (0.2 mM)
۴- آنزیم (51U) Taq DNA Polymerase ساخت شرکت Fermentas	با غلظت نهایی 0/2 IU
۵- پرایمر (Reverse) P33	۱۰ پیکومول
۶- پرایمر (Forward) P32	۱۰ پیکومول
۷- آب مقطر فاقد RNase	۱۵ میکرو لیتر
۸- cDNA (بمیزان ۱۰ درصد)	۲/۵ میکرو لیتر
حجم نهایی	۲۵ میکرو لیتر

جدول ۱-۲- نتایج آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب نوع و نتیجه.

نوع تست	نتیجه تست		مثبت		منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
RT-PCR	۳۸	۴۶/۹	۴۳	۵۲/۱	۸۱	۱۰۰		
الیزا	۳۱	۳۹/۷	۴۷	۶۰/۳	۷۸	۱۰۰		

بر اساس علائم بالینی و ارسال نمونه توسط دامپزشکان استان در سال ۸۳ چهل و یک کانون و در سال ۸۴ (تا دی ماه) چهل و دو کانون بود، تعداد کانون‌هایی که وجود بیماری در آنها بر اساس آزمایش‌های الیزا یا RP-PCR مورد تأیید قرار گرفتند دوازده کانون در سال ۸۳ و بیست و سه کانون در سال ۸۴ (تا دی ماه) می‌باشد. شهر مشهد بیشترین نمونه ارسالی و بیشترین نمونه تأیید شده را داشته است. اما حدوداً ۵۰ درصد از نمونه‌های ارسالی در آزمایش‌های یاد شده مثبت بوده است.

بر اساس نتایج مربوط به ضریب همبستگی بین دو صفت نسبت آلودگی گاوهای هر شهرستان و تراکم گوسفندان آن شهرستان معین گردید که با افزایش تراکم گوسفند نسبت آلودگی در گاو کاهش می‌یابد ( $r = -0/431$ ) اما آزمون t مربوطه این اختلاف را معنی‌دار ندانست ( $p = 0/394$ ).

بیشترین زمان گزارش دهی، ارسال نمونه‌ها و تأیید بیماری در فصل بهار می‌باشد.

۲-۲- روشهای تجزیه و تحلیل داده‌ها: در این بررسی محور قضاوت در مورد آلوده بودن نمونه‌ها از کانون‌های مشکوک نتایج آزمایشات ELISA یا RT-PCR می‌باشد توزیع نتایج بدست آمده بر اساس نام شهرستان و ماه جداسازی به صورت فراوانی نسبی در قالب نمودارهای ستونی و دایره‌ای تهیه گردید. همچنین به منظور سنجش رابطه بین تراکم جمعیت گوسفند و آلودگی به ویروس در گاو، موارد مثبت گزارش شده در گاو به جمعیت گاوهای همان شهرستان تقسیم و نسبت آلودگی به دست آمده برای هر شهرستان با جمعیت گوسفند موجود در آن دو به دو مقایسه و ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید.

## بحث

بیماری تب برفکی در ایران به صورت اپی‌زئوتیک وجود دارد (۱۳). ویروس‌های در حال گردش (O, A, Asia 1) هر ساله با درگیر کردن جمعیت دامی استان سبب بروز خسارت اقتصادی می‌گردند. در این مطالعه ۳۹/۱ درصد از نمونه‌های مشکوک توسط الیزا و ۴۶/۹ درصد بوسیله RT-PCR مثبت تلقی شدند. به طور کلی جراحات ایجاد شده در بیماری تب برفکی ممکن است با جراحات ایجاد شده توسط ورم پستان هرپس ویروسی، بیماری مخاطی (MD) و طاعون در گاو، زبان آبی، PPR، تب نزله‌ای بدخیم، اکتیمای واگیر و کننیدگی سم در گوسفند اشتباه شود (۳، ۱۴) اینک چرا با توجه به حساسیت زیاد آزمایش‌های استفاده شده درصد زیادی از نمونه‌ها منفی

فاقد RNase محلول و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد جهت انجام مراحل بعد نگهداری شد.

۳-۱- انتخاب پرایمر: توالی اسیدهای نوکلئیک پرایمرها بر اساس آنچه K.De Clerq و Vngryspere توصیه نموده (۱۷) انتخاب شد. از پرایمرهای universal P33 و P32 برای تشخیص ویروس تب برفکی استفاده گردید. Vngryspere و همکاران اشاره دارند که این پرایمرها از ناحیه محافظت شده B2 ژنوم ویروس تب برفکی بوده و هیچ واکنش متقاطع با سایر ویروس‌هایی که بیماری وزیکولی ایجاد می‌کنند و ممکن است با ویروس تب برفکی اشتباه شوند نشان نمی‌دهد (۵، ۱۷).

از پرایمرهای اختصاصی P33 و P38 برای تعیین تیپ ویروس تیپ O، از پرایمرهای P33 و P74-77 برای تیپ Asia 1 و از پرایمرهای P33 و P87-92 برای تیپ A استفاده شد. پرایمرهای به کار رفته برای شناسایی تیپ‌های ویروس تب برفکی در انتهای ناحیه D1 ژن FMDV می‌باشند (۵، ۱۷). این پرایمرها توسط شرکت TANG td-UK کشور انگلستان ساخته شد.

۴-۱- واکنش نسخه برداری وارونه و PCR: ساخت رشته cDNA با استفاده از dNTP، آنزیم M-Mlv، بافر آنزیم RT، RNase inhibitor، در حجم ۲۵ میکرو لیتر انجام گرفت. از پرایمر P33 در این مرحله استفاده شد (۱۷). ۲/۵ میکرو لیتر از cDNA با ۲۱ میکرو لیتر از محلول PCR برای حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر مخلوط گردید.

محصول PCR به روش ژل آگاروز ۲ درصد حاوی محلول اتیدיום بروماید الکتروفورز شد و با استفاده از UV مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

۵-۱- ELISA: تشخیص نمونه‌ها بوسیله کیت ساندویچ الیزا غیر مستقیم ساخته شده توسط آزمایشگاه رفرانس جهانی تب برفکی (WRL) طبق دستور العمل انجام گرفت (۱۲).

کیت مذکور بر اساس دستور العمل استاندارد ساندویچ الیزا غیر مستقیم جهت تشخیص حضور آنتی‌ژن‌های ویروس تب برفکی در نمونه‌های بافتی طراحی گردیده است.

## نتایج

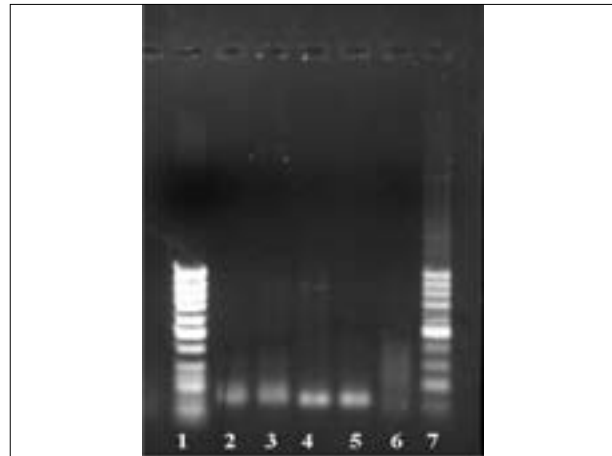
در بررسی حاضر که طی ۲۳ ماه انجام پذیرفت، تعداد کانون‌های مشکوک





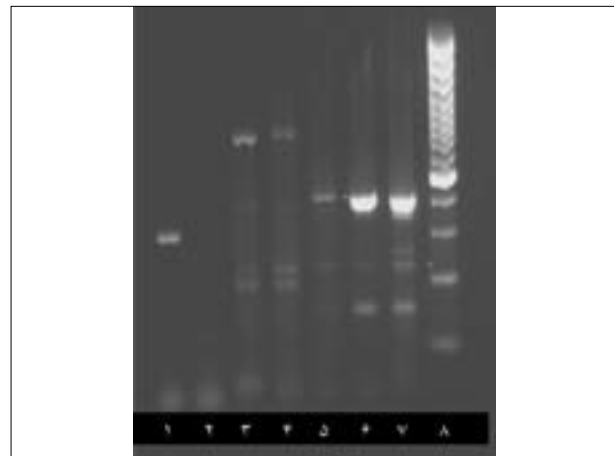
## References

۱. رشتی باف، م. (۱۳۸۱): روند پنج ساله (۱۳۷۵-۱۳۸۰) تب برفکی در استان خراسان. فصلنامه جامعه دامپزشکان خراسان - شماره ۱ - پاییز ۱۳۸۱ - صفحه: ۴۲-۴۷.
۲. قریشی، س.ع.، دلیری، م.م.، حاجیان، ت.، بانویی، م.م.، الوندی، ع. (۱۳۸۰): تشخیص ویروس تب برفکی در نمونه‌های کلینیکی به روش RT-PCR - پژوهش و سازندگی، شماره ۵۳، زمستان ۱۳۸۰ - ۱۰-۱۲.
۳. کیوانفر، ه.، کریمی، ن. (۱۳۸۶): ویروس شناسی دامپزشکی. تالیف، اف، جی، فخر، بخش بیماریها، انتشارات دانشگاه تهران.
۴. مهریانی، ه.، ایزدی، ح.، صالحی زاده، م.، خراسانی، ا.، تقی زاده، م.، قرشی، س.ع.، غفاری، ج. (۱۳۸۴): تهیه واکسن جدید تب برفکی با استفاده از سویه جدید A05/IR، چهاردهمین گنگره دامپزشکی ایران، تهران، اسفند ۱۳۸۴.
5. Callens, M., De Clercq, K., Gruia, M. and 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. Quart.* 20 (Suppl. 2) S37- S40.
6. Donaldson, A.I. (2000) The role of sheep in the epidemiology of foot-and-mouth disease and proposals for control and eradication in animal populations with a high density of sheep. Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD, Borovets, Bulgaria, 5 to 8 September 2000.
7. Firouzi, M.R., Amighi, M., Piroird, R., Lombard, M., Favere, H., Salehizadeh, M. (1985) The Foot and Mouth disease situation in Iran in 1980-1984- *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 4:311-317.
8. Ferris, ND., Dowson, M. (1988) Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with food-and-mouth and swine vesicular disease. *Vet. Microbio.* 16:201-209.
9. Gilbert, M., Aktas, S., Alisafar, M., Otarod, V., Sumptio, K., Tufan, M., Slingenbergh, J: FMD in Turkey and Iran - trends and relationships [fao.org/ag/againfo/commissions/docs/greece04/App30.pdf](http://fao.org/ag/againfo/commissions/docs/greece04/App30.pdf).
10. Hughes, G.J., Mioulet, V., Haydon, D.T., Kitching, R, 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.
11. Kitching, R.P., Hughest, G.J. (2002) Clinical variation in foot and mouth disease; sheep and goats. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 21: 505-512.
12. OIE (2000) [OIE.int/eng/normes/mmanual/A-00022](http://OIE.int/eng/normes/mmanual/A-00022).



تصویر ۱-۲- نتایج حاصل تشخیص ویروس تب برفکی.

بوسیله آزمایش RP-PCR: 1,7: مارکر ۱۰۰ جفت باز: ۶ کنترل منفی: ۵ کنترل مثبت 2,3,4: نمونه‌های مثبت ۱۳۱ جفت باز.



تصویر ۲-۲- نتایج حاصل از تعیین تیپ ویروس های تب برفکی.

بوسیله آزمایش RP-PCR: ۱: تیپ Asia 1 ۲۹۷bp شماره ۲: کنترل منفی شماره ۳ و ۴: تیپ A- ۷۳۲bp شماره ۵ و ۶: تیپ O ۴۰۲bp شماره ۷: کنترل مثبت شماره ۸: مارکر ۱۰۰bp.

دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران همچنین شورای پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخاطر مساعدت‌های انجام گرفته. بدینوسیله از زحمات و همکاری آقایان داود خانی، دکتر گارگر، دکتر ایزدی، دکتر صالحی زاده، دکتر مهریانی، دکتر خراسانی، دکتر نجفی، دکتر قریشی، دکتر بهاری، دکتر اسدزاده، دکتر ناظم شیرازی، دکتر دستور، دکتر رشتی باف، دکتر چرخکار، دکتر راعی، دکتر طالب شوشتری، دکتر همتی و سرکار خانم دکتر صدیقی مقدم و سرکار خانم بهجتی تشکر و قدردانی می‌شود. از اعضاء هیئت علمی و کارکنان بخش تب برفکی موسسه رازی، اداره بررسی‌های اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی و بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی موسسه رازی شعبه مشهد نیز تشکر می‌نمائیم.



- htm; manual of standard for diagnosis test and vaccines, 4<sup>th</sup> Ed., 2000.
13. OEI.(2002) foot and mouth disease: Facing the new dilemmas; volume 21: December 2002.
  14. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J.(1999) *Veterinary Virology*, 3<sup>rd</sup>Ed. Academic Press. pp. 521-528.
  15. Reid, S.M. Forsyth, M.A., Hutching, G.H. and Ferris, 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.
  16. Reid, S.M., Forsyth, M.A., Hutchings,G., HFerris, N.P.De., Clercq, K.(1999) Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterization of viral RNA in clinical samples: *J. Virol. Method.* 83:113-123.
  17. Vangrypserrwe, 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 isolation, combined whit a simultaneous differentiation with other gnomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Viril.*141:331-344.



# IDENTIFICATION OF THE FOOT AND MOUTH DISEASE FOCI FROM SUSCEPTIBLE FOCI IN KHORASAN-RAZAVI PROVINCE

Zibaei, S.<sup>1\*</sup>, Keivanfar, H.<sup>2</sup>, Rabbani, M.<sup>2</sup>, Kianizade, M.<sup>1</sup>, Hemmatzadeh, F.<sup>2</sup>, Bokaie, S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Razi Vaccine and Serum Research Institute - Mashhad-Iran

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

<sup>3</sup>Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

(Received 11 April 2005, Accepted 24 February 2006)

---

## Abstract:

This study was conducted in Khorasan-Razavi during 23 months (since February 2004 to December 2005). The samples (83 samples) of suspected farms were collected from tongue and mouth epithelium and tested by indirect sandwich ELISA and RT-PCR. During the study, twelve foci during the year 2004 and 23 foci during the year 2005 (up to December) were approved. Maximum distribution of FMD foci was observed in spring (63%). Pearson's correlation coefficient and Chi-square tests were carried out for data analysis. Attention was paid to frequent traffic of farm in springs since there is an increase of the disease in this season. There was no correlation between the sheep density and the disease must be account in cattle. However, with respect to considerable sheep population in Iran and its role in persistence of the virus, the vaccination of sheep seems to be essential for the control of FMD.

**Key words:** FMD, Khorasan Razavi province, foci.

