مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۵، ۲۵۵-۲۵۱

بررسی نمونه‌های اپی تلیوم دهان ارسالی به مرکز تشخیص دامپزشکی طی سال‌های ۸۰ - ۷۹، نسبت به حضور ویروس تب برفکی با استفاده از آزمون‌های ثبوت عناصر مکمل، الایزا و کشت سلول و همچنین بررسی پراکندگی وقوع آن در ایران

مسعود حسینی [۱،۲]* نسرین محمودان [۱،۳] غلامعلی کیانی [۱] رقیه صدیقی مقدم [۱] رضا حسن زاده [۱] لاله معظمی [۱] محمد حسن روستائی [۳]

۱)مرکز تشخیص و کنترل دارو و فرآورده‌های بیولوژیک، سازمان دامپزشکی کل کشور، تهران -ایران.
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران -ایران.
۳) گروه ویروس شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران -ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۲۸ اسفندماه ۱۳۸۵)

چکیده

هدف از مطالعه فعلی مقایسه سه روش تشخیصی تعیین هویت ویروس تب برفکی بر روی نمونه‌های اپی تلیوم دهان و بررسی توزیع سروتایپ‌های O_1، A، Asia1 در ایران است. برای این منظور ۳۳۸ رأس گاو و ۳۴ رأس گوسفند مورد مطالعه قرار گرفتند. برای این منظور سوسپانسیون حاوی ویروس بدست آمده از درمان اپی تلیوم‌های دهان، با استفاده از سه آزمون ثبوت عناصر مکمل (CF)، آنتی ژن الایزا (Ag-ELISA) و جداسازی ویروس با استفاده از تیره سلولی BHK-21، مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۱۵۱ نمونه از ۳۷۲ (۴۰ درصد) نمونه اپی تلیوم دهان گاو و گوسفند ارسالی به مرکز تشخیص دامپزشکی از استانهای مختلف، به مدت یک سال (فروردین ۱۳۷۹ الی ۱۳۸۰) با استفاده از آزمون CF، مثبت تشخیص داده شدند. ویروس تب برفکی از ۷۸ نمونه از ۱۰۰ نمونه ارسالی، در کشت سلولی جدا گردیدند، که از این میان، تعداد ۲۵ نمونه (۳۰) در آزمون CF و تعداد ۵۰ نمونه (۶۴ درصد) در آزمون الایزا مثبت گزارش شدند. حساسیت آزمون الایزا در شناسائی حضور ویروس حداقل ۲ برابر روش CF می‌باشد. استان تهران در میان استانها و ناحیه شمال غرب ایران بالاترین میزان شیوع تب برفکی را در سالهای ۸۰ -۷۹ داشته اند.

واژه‌های کلیدی: ویروس تب برفکی، ثبوت عناصر مکمل، الایزا، کشت سلولی، جداسازی و تعیین هویت ویروس.

مقدمه

بیماری به شدت مسری تب برفکی (FMD: Foot-and-Mouth Disease) در زوج سمان اهلی و وحشی بوسیله آفتوویروس‌ها از خانواده پیکورناویریده (Picornaviridae Family; Aphtoviruses) تولید می‌شود. ویروس تب برفکی دارای حداقل ۷ سروتایپ A، O_1، Asia1، SAT 1 - 3،C در دنیا می‌باشد.

شیوع بیماری تب برفکی تاریخ طولانی در ایران دارد (جدول ۱) به طوری‌که اولین گزارش در سال ۱۹۵۵ از سروتایپ O_1 می‌باشد.

آزمون آنتی بادی و آنتی ژن الایزای تب برفکی به‌عنوان یک آزمون بین‌المللی به‌منظور شناسائی آنتی ژن‌ها و سروتایپ‌ها و حتی ساب تایپ‌های مختلف ویروس تب برفکی در مقایسه با آزمون ثبوت عناصر مکمل Complement Fixation Test (CFT) مطرح می‌باشد(۱). این امر بدلیل

جدول ۱- تاریخ مهمترین شیوع بیماری تب برفکی در ایران (۸، ۷، ۶، ۳، ۲).

سروتایپ جداشده	O_1	A_{22}	SAT_1 (۱)	A_{22}, O_1	Asia1	A_{87}	A_{96} (۲)
سال شیوع	۱۹۵۵	۱۹۶۰	۱۹۶۲	۱۹۶۴	۱۹۵۷	۱۹۸۷	۱۹۹۶

۱- از سال ۱۹۶۲ تاکنون گزارش دیگری از شیوع این سروتایپ در ایران وجود ندارد.
۲- از سال ۱۹۹۶ ساب تایپ‌های مختلفی از سروتایپ A جدا شده است اما سبب بیماریهای جدی نبوده است.

حساسیت و اختصاصیت بیشتر آزمون ساندویچی غیر مستقیم الایزا (Indirect Sandwich ELISA) که بوسیله آزمایشگاه مرجع جهانی تب برفکی در پربرایت انگلستان (FMD World Reference Laboratory, Pirbright,UK) تولید می‌شود، می‌باشد. نتایج بدست آمده از آزمون ثبوت عناصر مکمل تحت تاثیر پیش فاکتورها و ضد فاکتورهای کمپلمان قرار می‌گیرد که در نتیجه نتایج را غیر حساس می‌نماید.

در این مطالعه شناسائی ویروس تب برفکی با دو آزمون ثبوت عناصر مکمل و الایزا مقایسه گردید و نتایج کلی آنها با جداسازی ویروس در تیره سلولی BHK-21 مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین چرخش سویه‌های مختلف ویروس تب برفکی بین فروردین ۱۳۷۹ تا فروردین ۱۳۸۰ در ایران، براساس نمونه‌های ارسالی به مرکز تشخیص و کنترل دارو و فرآورده‌های بیولوژیک سازمان دامپزشکی کل کشور، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

آماده سازی نمونه‌ها: تمامی نمونه‌های اپی تلیوم زبان که به مرکز تشخیص دامپزشکی ارسال می‌گردید بلافاصله بعد از دریافت در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد ذخیره می‌گردیدند. بعد از کنترل کیفیت نمونه از نظر pH، وزن، ظاهر و حضور در بافر مخصوص حمل و نقل نمونه مرضی مشکوک به تب برفکی (۵۰ درصد گلیسرول، ۵۰ درصد فسفات ۰/۰۴ مولار، pH = 7.4)، در دفتر ثبت نمونه‌ها، ثبت می‌گردید. نمونه مورد نظر با استفاده از هاون و شن

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۲۲۷۳۶۰۴۴-۰۲۱ نمابر: ۲۹۹۰۲۷۲۱-۰۲۱ Email:Ma_Hosseini @ sbu.ac.ir

جدول ۲- نتایج آزمون نمونه‌های اپی تلیوم دهان برای ویروس تب برفکی با استفاده از آزمون CF_1T و الایزا در مقایسه با روش جداسازی ویروس با استفاده از خط سلولی BHK-21.

		جداسازی ویروس		تعداد کل نمونه‌ها
		مثبت	منفی	
آزمون CF1	مثبت	۲۴	۲	۱۰۰
	منفی	۵۰	۲۰	
آزمون الایزا	مثبت	۵۰	۳	
	منفی	۲۹	۱۹	

استریل در شرایط محیطی هودمیکروبیولوژی کلاس II کاملاً تکه تکه می‌گردید. بافر PBSA به نسبت ۱:۵ به عنوان محلولی که بافت اپی تلیوم زبان درآن معلق میگردید مورد استفاده قرار گرفت. مایع روئی بدست آمده بعد از سانتریفوژ، که بافر حاصل از بافت اپی تلیوم زبان سلایه شده بود، به‌عنوان منبع ویروس(سوسپانسیون حاوی ویروس)مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون حاوی ویروس به سه قسمت تقسیم گردید: قسمت اول: با افزودن حدود ۲ میلی لیتر کلروفرم جهت آزمون ثبوت عناصر مکمل مورد استفاده قرار گرفت، قسمت دوم: به صورت محلول ۱۰درصد با PBSA و افزودن آنتی بیوتیک جهت کشت سلولی در۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره‌سازی گردید و قسمت سوم: جهت آزمون الایزا در ۲۰-درجه سانتیگراد نگهداری شد.

آزمون ثبوت عناصر مکمل: این آزمون در میکروپلیت‌های ته گرد و با روش توضیح داده شده توسط موسسه رازی(۵،۶)انجام پذیرفت. تمامی معرف‌های مربوط به انجام این آزمون از آزمایشگاه تب برفکی موسسه رازی، کرج، ایران، تهیه گردیدند.

آزمون الایزا: کیت‌های الایزا از آزمایشگاه مرجع جهانی تب برفکی، پر برایت انگلستان تهیه گردیدند. این کیت‌ها دارای معرف‌های لازم جهت شناسائی سه سویه آنتی ژن A, O_1, Asia1 بودند. نوع آزمون الایزا «غیر مستقیم ساندویچی» می‌باشد. سوسپانسیون حاوی ویروس بدست آمده از سلایه نمونه مرضی به‌عنوان منبع آنتی ژن به هر چاهک جهت آزمون اضافه گردید.

جداسازی ویروس: تیره سلولی تک لایه BHK-21، از بانک سلولی ملی ایران(NCBI)، موسسه پاستور، تهیه گردید. محیط کشت (.Gibco, Co) GMEM و ۵درصد سرم خون جنین گاو پرتودرمانی شده (Irradiated FBS) (Gibco, Co.Gamma) به عنوان محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند. حساسیت این تیره سلولی نسبت به عفونت ویروس تب برفکی از قبل در آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز تشخیص، مورد آزمون و تأیید قرار گرفته بود. آلوده نمودن سلول‌ها بوسیله ویروس تب برفکی یا نمونه مشکوک مرضی به هنگامی صورت پذیرفت که تراکم سلولی حدود۸۰درصد می‌گردید. میزان ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی ویروس جهت کشت سلولی به سلول‌ها اضافه گردیدند. مجاورت سلول‌ها با نمونه مرضی به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷درجه سانتیگراد انجام پذیرفت و سپس بعد از تخلیه

جدول ۳- نتایج بررسی نمونه‌هائی(ICCSF)که در تیره سلولی BHK-21 علائم CPF را نشان داده اند در آزمون CF_2T.

		نمونه‌های ICCSF که در BHK-21 تولید CPF نموده اند		تعداد کل نمونه‌ها
		مثبت	منفی	
آزمون CF_2T	مثبت	۷۸	۰	۱۰۰
	منفی	۰	۲۲	

سوسپانسیون، محیط کشت نگهدارنده(GMEM + 2%FBS)به سلول افزوده و برای مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷درجه سانتیگراد نگهداری و بطور روزانه برای حضور CPE(Cytopathic effects) مورد بررسی قرار گرفتند. به ازاء هر نمونه مرضی فقط یک کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفت. مایع روئی کشت سلول هائی که (Cell Culture Supernatant Fluid ICCSF: Infectious) صد در صد CPE نشان داده بودند جمع آوری و بعد از سانتریفوژ نمودن جهت آزمون‌های بعدی در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردیدند.

مراحل انجام آزمون: سوسپانسیون حاوی ویروس به منظور شناسائی حضور ویروس تب برفکی با آزمون‌های الایزا و ثبوت عناصر مکمل(CF_1T)و همچنین جهت تزریق به کشت سلولی BHK-21 پروسس گردیدند. همچنین مایع ICCSF از کشت سلولی BHK-21 که CPE نشان دادند جهت انجام آزمون ثبوت عناصر مکمل(CF_2T)نیز پروسس شدند.

نتایج

در مجموع تعداد ۱۰۰ نمونه اپی تلیوم دهان با استفاده از CF_1T، الایزا و کشت سلولی BHK-21 مورد ارزیابی قرار گرفتند، به طوری‌که از ۷۸ نمونه(۷۸درصد)، ویروس تب برفکی در کشت سلول جدا گردید. از این تعداد، ۲۴ نمونه (۳۰ درصد)در آزمون ثبوت عناصر مکمل، مثبت و تعداد ۵۰ نمونه(۶۴درصد)در آزمون الایزا، مثبت تشخیص داده شدند(جدول ۲). لذا آزمون آنتی ژن الایزا حداقل ۲ برابر حساس تر از آزمون ثبوت عناصر مکمل(CF_1T)در شناسائی حضور ویروس در نمونه اپی تلیوم دهان ارزیابی گردید. تمامی نمونه‌هائی که در آزمون ثبوت عناصر مکمل مثبت بودند در آزمون الایزا نیز مثبت بودند، به جز ۴ نمونه که همگی آنها O_1 بودند. تمامی نمونه‌هائی که در آزمون ثبوت عناصر مکمل و الایزا مثبت بودند در کشت سلولی نیز مثبت تشخیص داده شدند.

تعداد ۵۰ نمونه از ۷۸ نمونه(۶۴درصد)و تعداد ۲۹ نمونه از ۷۸ نمونه(۳۷درصد)، به ترتیب در آزمون‌های CF_1T و الایزا، منفی کاذب تشخیص داده شدند(جدول۲). ویروس در دو نمونه از ۲۶ نمونه که در آزمون CF_1T مثبت بودند، و در سه نمونه از ۵۳ نمونه که در آزمون الایزا مثبت بودند، در کشت سلولی منفی تشخیص داده شدند.

محلول ICCSF تهیه شده از کشت سلولی(BHK-21)که مثبت تشخیص داده شده بودند(۷۸ نمونه)، تماماً در آزمون ثبوت عناصر

جدول ۴- میزان شیوع سروتایپ‌های مختلف ویروس تب برفکی در یک سال (فروردین ۱۳۷۹ الی فروردین ۱۳۸۰) در ایران.

ماه	استان	سروتیپ A_{87} (۱)	سروتیپ O_1	سروتیپ Asia1	نامشخص A/O_1	تعداد کل
۷۹/۱/۱۵ الی ۷۹/۱/۳۱	اردبیل	۲	۲	-	۱	۷
	خراسان	۱	-	-	-	
	کردستان	۱	-	-	-	
اردیبهشت ۷۹	قم	–	۱	-		۱۴
	قزوین	۱	-	-	-	
	تهران	–	۳	-	-	
	آذربایجان غربی	۲(S) (۲)	۲	-	-	
	کردستان	۱	-	-	-	
	گلستان	–	۳	-	-	
	خوزستان	۱	-	-	-	
تیر ۷۹	آذربایجان غربی	۱	۳	-	-	۲۲
	آذربایجان شرق	–	۱	۱	۱	
	کردستان	–	۱	-	-	
	اردبیل	۲	۲	-	۲	
	تهران	–	۳	-	۱	
	سمنان	–	-	-	۱	
	خراسان	۱(S)	-	۱	-	
	آذربایجان شرقی	۱	-	-	-	
مرداد ۷۹	آذربایجان غربی	۲(S)	-	۱	-	۱۴
	اصفهان	۴ (۳)	-	۱	-	
	تهران	۲	-	-	-	
	قم	–	۲	-	-	
	کردستان	۲(S)	-	-	-	
شهریور ۷۹	تهران	۴	۶	-	-	۱۴
	خراسان	۱(S)	۱	-	-	
	اصفهان	–	۱	-	-	
	فارس	۱	-	-	-	
مهر ۷۹	مرکزی	–	۱(S)	-	-	۶
	خراسان	–	۱(S)	-	-	
	کردستان	–	۱	-	-	
	تهران	–	۱	-	-	
	فارس	–	۱	-	-	
	آذربایجان غربی	۱	-	-	-	
آبان ۷۹	تهران	۳	-	-	۱	۵
	مرکزی	–	۱	-	-	
آذر ۷۹	تهران	۲	۱	-	-	۵
	آذربایجان شرقی	۱	۱	-	-	
دی ۷۹	فارس	–	۲(S)	۲	-	۶
	قزوین	۱	-	-	-	
	مرکزی	–	۱(S)	-	-	
بهمن ۷۹	فارس	-	۲	۴	۲	۳۲
	کرمان	-	-	۱	-	
	خراسان	–	۳(S)	۱	-	
	تهران	–	۲	۱	-	
	آذربایجان غربی	–	۱(S)	-	۱(S)	
	آذربایجان شرقی	-	۱	-	۲	
	سمنان	-	-	۲	-	
	قزوین	-	۲	۱	-	
	چهارمحال بختیاری	-	۱	-	-	
	اصفهان	-	۲	-	-	
	سیستان و بلوچستان	-	۱	-	-	
	یزد	۱	-	-	-	
	ایلام	-	۱	-	-	
اسفند ۷۹	آذربایجان شرقی	-	۱	-	-	۲۴
	کرمان	-	-	۲	-	
	سمنان	-	-	۴	-	
	فارس	-	۲	-	-	
	قم	-	۴	۲	-	
	تهران	-	-	۱	-	
	اصفهان	-	-	۴	-	
	قزوین	-	-	۱	-	
	تهران	-	-	۳	-	
فروردین ۸۰	خراسان	-	-	۱	-	۳
	قم	-	-	۲	-	
جمع کل		۳۸	۶۵	۳۶	۱۲	۱۵۲

۱- سروتیپ A_{87} برای اولین بار از ناحیه مرد آباد در استان تهران در سال ۱۹۸۷ جدا گردید. ۲- تمامی نمونه‌های دریافتی از گاو می‌باشند بجز آنهائی که با علامت S(Sheep) مشخص گردیده‌اند. ۳- تنها سروتیپ A_{22} جدا شده در این سال.

مکمل(CF_2T)نیز مثبت بودند(جدول ۳). این مطلب در مورد استفاده از تیره سلولی IB-RS-2 (Pig Kidney) بدلیل تأثیر عوامل ضد کمپلمان موجود در آن، در آزمون ثبوت عناصر مکمل قابل تعمیم نمی باشد(جزئیات نتایج نشان داده نشده است). همچنین تعداد ۲۲ نمونه منفی در کشت سلولی BHK-21 نیز در آزمون ثبوت عناصر مکمل منفی بودند.

توزیع سروتایپ‌های ویروس تب برفکی بر روی ۳۷۲ نمونه اپی تلیوم دهان ارسالی از سراسر ایران، با استفاده از آزمون ثبوت عناصر مکمل(CF_1T)در جداول ۴ و ۵ خلاصه شده اند. تعداد ۱۵۱ نمونه(۴۰درصد)از ۳۷۲ نمونه ارسالی نسبت به حداقل یک سروتایپ ویروس تب برفکی مثبت بودند. از تعداد ۱۵۱ نمونه مثبت، ۱۵ نمونه مربوط به گوسفند و مابقی(۱۳۱ نمونه)مربوط به گاو بوده است. بیشتر نمونه‌ها در بهمن ماه ۷۹ (۳۲ عدد)و در اسفند ۷۹ (۲۱ عدد)و حداقل نمونه‌ها در آذرماه ۷۹ (۲ عدد)به مرکز تشخیص ارسال شدند. فراوانی نوع سروتایپ‌های جدا شده، در طی این مطالعه، به ترتیب O_1 با ۴۳درصد، A با ۲۵درصد، Asia1 با ۲۴ درصد و سروتایپ‌های A/O_1 با ۸درصد تعیین گردیدند. هیچگونه نمونه مرضی در خرداد ماه ۷۹ به مرکز تشخیص ارسال نگردید، که البته بدین معنا نیست که بیماری در این ماه اتفاق نیفتاده است. بالاترین میزان یا تعداد موارد آلودگی (۳۴ عدد)مربوط به ناحیه شمال غربی ایران می باشد که البته در طی ماههای شهریور، آبان و آذر گزارش نگردیدند. استان تهران بالاترین میزان آلودگی (۳۱ مورد)را در میان استانهای کشور دارا بود.

پنج استان سیستان و بلوچستان، ایلام، یزد، خوزستان و چهار محال بختیاری کمترین میزان آلودگی (هر کدام ۱ مورد)را در میان استانها داشته اند.

بحث

از نظر تاریخی، تشخیص آزمایشگاهی تب برفکی بر اساس آزمون ثبوت عناصر مکمل می‌باشد، ولیکن بدلیل حساسیت کم این آزمون(۴،۱۱)، در مقایسه با آزمون الایزا، به عنوان یک آزمون قابل قبول در مبارزه ملی علیه بیماری مورد پذیرش نمی‌باشد.

در این مطالعه مشخص گردید که آزمون ثبوت عناصر مکمل نسبت به الایزا بر روی نمونه‌های مرضی اپی تلیوم دهان، از حساسیت کمتری برخوردار است. نتایج مشابهی توسط سایر محققین، در این خصوص گزارش گردیده است(۴،۱۱). در مجموع تعداد ۱۰۰ نمونه اپی تلیوم دهان مورد بررسی آزمایشگاهی جهت مقایسه سه آزمون ذکر شده قرار گرفتند، به طوری‌که تعداد ۷۸ نمونه(۷۸درصد)در روش کشت سلولی مثبت گزارش شدند. شناسائی و جداسازی ویروس تب برفکی در سیستم کشت سلولی در این مطالعه(۷۸درصد)قابل مقایسه با مطالعه مشابه در پربرایت(۷۰درصد)بر روی نمونه‌های مرضی اپی تلیوم دهان که بین سال‌های ۱۹۷۱ الی ۱۹۸۳ دریافت شده بود، می‌باشد(۴). بنظر می‌رسد افزایش درصد جداسازی ویروس بیشتر مربوط به حضور بیشتر ویروس های زنده در نمونه های مرضی در زمان انجام کشت سلولی، با توجه به کوتاه بودن فاصله زمانی بین اخذ نمونه و انجام آزمون در ایران، می باشد. البته بدون شک با انجام پاساژهای متناوب بر روی همان تیره سلولی BHK-21 و یا کشت سلولی اولیه تیروئید یا کلیه گاو شانس جداسازی ویروس را می توان افزایش داد. همچنین عدم در دسترس بودن محیط مخصوص حمل و نقل نمونه تب برفکی در ادارات دامپزشکی می تواند در تعداد ویروس‌های زنده موجود در نمونه مرضی تأثیر بگذارد. مضافاً اینکه بعد از تحویل نمونه به آزمایشگاه، درجه حرارت مناسب ذخیره سازی نمونه و پیروی از فرآیند مطلوب آماده سازی نمونه جهت انجام آزمون‌های درخواستی میتواند بر روی قدرت عفونت زائی ویروس تب برفکی تأثیر بگذارد.

در این مطالعه ویروس های تب برفکی در ۳۰درصد و ۶۴درصد به ترتیب با آزمون های CF_1T و الایزا، بر روی نمونه هائیکه با کشت سلول قبلاً مثبت شده بودند، نیز مثبت تشخیص داده شدند. میزان یا درصد شناسائی ویروس در نمونه‌های مرضی با آزمون CF_2T، ۳۰درصد، به میزان ۵درصد بیشتر از نتایج بدست آمده توسط آزمایشگاه پربرایت(۲۵درصد)(۴)و به میزان ۶درصد بیشتر از نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر (۲۶درصد)(۱۱)بوده است. بنظر می‌رسد که این افزایش مربوط به استفاده از معرف‌های سرمی تهیه شده توسط موسسه رازی که بر اساس سویه‌های تب برفکی ایران بدست آورده شده است، می باشد(۶).

در این مطالعه آزمون الایزا حداقل ۲ برابر حساس تر از آزمون CF_1T، در مقایسه با سایر مطالعات که ۳ برابر(۹)و ۳/۵ برابر(۱۱)، تشخیص داده شد، می‌باشد.

مطالعه حاضر، به خوبی نشان می‌دهد که آزمون ثبوت عناصر مکمل با توجه به در دسترس تر بودن و ارزان تر بودن میتواند به‌عنوان بهترین آزمون جهت شناسائی و تعیین سویه تب برفکی در مایع ICCSF باشد. لذا از نظر مراحل کاری، توصیه می‌شود که در ابتدا بر روی تمامی نمونه‌های مرضی آزمون ثبوت عناصر مکمل انجام گردد و در صورت منفی بودن نمونه، در مرحله بعدی از کشت سلولی جهت تکثیر ویروس، در صورت وجود، به منظور افزایش عیار آن استفاده شود و سپس بر روی مایع روئی کشت سلولی(CCSF)آزمون ثبوت عناصر مکمل انجام پذیرد. همچنین این روش به هنگامی که بدلائلی کیت الایزا در دسترس نمی‌باشد می تواند کاربرد مطلوبی داشته باشد.

بالاترین میزان شیوع تب برفکی بر اساس تعداد نمونه‌های ارسالی به مرکز تشخیص، از شمال غربی ایران مشاهده گردید. از این ناحیه بایستی به عنوان منطقه حائل(Buffer Zone)بین ایران و همسایگان مربوطه نام برد. اگر چه یک برنامه کامل واکسیناسیون در سطح ملی جاری نمی‌باشد ولی بنظر می‌رسد که تصمیمی مدبرانه خواهد بود اگر کلیه دامهای حساس اعم از گاو، گوسفند و بز در ناحیه شمال غربی ایران تحت برنامه واکسیناسیون کامل قرار بگیرد. شهر تهران و استان تهران همواره به‌علت وضعیت جغرافیائی و اجتماعی دامپروری و بازار مصرف محصولات دامی منحصر به

فرد خود به‌عنوان مرکز جمع آوری و انتشار بیماریها و بخصوص بیماریهای ویروسی در ایران مطرح بوده است، به طوری‌که شاید بتوان این منطقه را به عنوان شاخص (National Disease Indicator) بیماریهای دامپزشکی در ایران قلمداد نمود. نمونه‌های ارسالی به مرکز تشخیص از ۱۹ استان از کل ۲۸ استان ایران بودند، البته این امر بدین معنا نمی‌باشد که در سایر استانها بیماری اتفاق نیفتاده است.

تشکر و قدردانی

مؤلفین مایلند از زحمات و کمک‌های فنی آقای محمد حسین پراوند و سرکار خانم مریم بهجتی اردکانی صمیمانه قدردانی نمایند.

References

1. Donaldson, A.I., Kitching, R.P., Barnett, P.V.(2004) Foot and Mouth disease. OIE Man. of Stan. for Diag. Tests and Vacc. 47-56.
2. Ferris, N.P., Donaldson, A.I.(1992) The world reference laboratory for foot-and-mouth disease: a review of thirty-three years of activity (1958-1991). Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 11: 657-684.
3. Firouzi-Bandpay, M.R., Amighi, M., Piroird, R., Lombard, M., Favre, H. and Salehizadeh, M.(1985) The foot and mouth disease situation in Iran in 1980-1984. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 4: 311-317.
4. Hamblin, C., Armstrong, R.M., Hedger, R.S.(1984) A rapid enzyme-linked immunosorbent assay to the detection and identification of foot-and-mouth disease viruses. Vet. Microbiol. 9:435-443.
5. Haratian, K.(1998) Application of serum neutralization test to evaluate the immunity of Tehran's cattles before and after vaccination against types A and O1 of foot-and-mouth disease (FMD). Master Thesis, Tarbiat Modarres Uni.
6. Mahmoudan, N.(2001) Study on mouth epithelium samples submitted to CVL during the year of 1379 using CF test and ELISA for detection of FMDV antigen. Master Thesis. Tarbiat Modarres Uni.
7. Marquardt, O., Freiberg, B.(2000) Antigenic variation among foot-and-mouth disease virus type A field isolates of 1997-1999 from Iran. Vet. Microbiol. 74:337-386.
8. Nad-Alian, M.G.(1999) The situation of FMD in cattle in Tehran region and isolated FMDV in Iran. The Eleventh Ann. Vet. Con. Tehran, 7-9 March, Iran. 135-137.
9. Roeder, P., Le Blanc Smith, P.M.(1987) The detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. Res. in Vet. Sci. 43:225-232.
10. Salehizadeh, M.(1990) Studies on the production of specific hyperimmune antisera against type A FMD virus. Arch. Inst. Razi. 41:106-111.
11. Westbury, H.A., Doughty, W.J., Forman, A.J., Tangchaitrong, S. and Kongthon, A.b.(1988) A comparison of enzyme0linked immunosorbent assay, complement fixation and virus isolation for foot-and-mouth disease diagnosis. Vet. Microbiol. 17:21-28.

A STUDY ON THE MOUTH EPITHELIUM SAMPLES SUBMITTED TO IRAN CENTRAL VETERINARY LABORATORY DURING THE YEAR OF 2000-2001, FOR FMDV INVESTIGATION, USING CFT, ELISA, AND VIRUS ISOLATION AND ITS PREVALENCE IN IRAN

Hosseini, M.[1-2]*, Mahmoudan, N.[1-3], Kiani, G.A.[1], Sedigeh-Moghadam, R.[1], Hassan-Zadeh, R.[1], Moazami, L.[1], Roostaee, M.H.[3]

[1]*Central Veterinary Laboratory, Iranian Veterinary Organization,Tehran-Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid-Beheshti University,Tehran-Iran.*

[3]*Department of Virology, Tarbiat Modarres University, Tehran-Iran.*

(Received 2 May 2005 , Accepted 18 March 2007)

Abstract:

The aim pf the present study was to compare three different methods for detection of food and mouth disease virus antigens(A, Asia1, O1)from mouth epithelium samples and also to monitore the distribution of FMDV serotypes 338 cattle and 34 sheep of Iran during 2000-2001. The suspension fluids of processed tongue epithelium samples were clarified by centrifugation and tested for presence of FMDV antigens. using Complement Fixation Test(CFT), Enzyme-linked Immuno-sorbant assay (ELISA) and inoculating onto BHK-21 cell culture. 151 out of 372 (40%) epithelium samples were positive to one of the FMD viruses, using CFT. These samples were collected from most provinces of Iran during one year (200-2001). The virus was isolated from 78 out of 100 mouth epithelium samples in BHK-21 cell culture. The CF and ELISA tests were positive in 25 (30%) and 50(64%), respectively. ELISA was at least two times more sensitive than the CFT for detection of FMDV in epithelial samples. The Northwest region showed the highest rate of infection in the country meanwhile, Tehran province had the highest rate of infection among provinces.

Key words: foot-and-mouth disease virus, CFT, ELISA, virus isolation.

***Corresponding author's email: ma_hosseini@sbu.ac.ir, Tel: 021- 29902721, Fax: 021-29902721**