

# 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<sup>۱،۲\*</sup>، نسرين محمودان<sup>۱،۳</sup>، غلامعلی کیانی<sup>۱</sup>، رقيه صديقي مقدم<sup>۱</sup>، رضا حسن زاده<sup>۱</sup>، لاله معظمی<sup>۱</sup>، محمد حسن روستائی<sup>۳</sup>

(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 روش تشخیصی تعیین هویت ویروس تب برفکی بر روی نمونه‌های اپی تلیوم دهان و بررسی توزیع سروتایپ‌های O<sub>1</sub>, A, Asia I 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 درصد) در آزمون CF و تعداد ۵۰ نمونه (۶۴ درصد) در آزمون الایزا مثبت گزارش شدند. حساسیت آزمون الایزا در شناسایی 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 داشته‌اند.

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

حساسیت و اختصاصیت بیشتر آزمون ساندویچی غیر مستقیم الایزا (Indirect Sandwich ELISA) که بوسیله آزمایشگاه مرجع جهانی تب برفکی در پربرایت انگلستان (Reference Laboratory, Pirbright, UK) FMD World 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 شناسایی 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، بر اساس 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- تا ۰- درجه سانتیگراد ذخیره می‌گردیدند. بعد از کنترل کیفیت نمونه از نظر pH، وزن، ظاهر و حضور در بافر مخصوص حمل و نقل نمونه مرزی 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

## 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; Aphotoviruses) تولید می‌شود. ویروس تب برفکی دارای حداقل ۷ سروتایپ A, O<sub>1</sub>, C, SAT 1-3, Asia I می‌باشد.

شیوع بیماری تب برفکی تاریخ طولانی در ایران دارد (جدول ۱) به طوری که اولین گزارش در سال ۱۹۵۵ از سروتایپ O<sub>1</sub> می‌باشد. آزمون آنتی بادی و آنتی ژن الایزا تب برفکی به عنوان یک آزمون بین‌المللی به منظور شناسایی آنتی ژن‌ها و سروتایپ‌ها و حتی ساب تایپ‌های مختلف ویروس تب برفکی در مقایسه با آزمون ثبوت عناصر مکمل (CFT) Complement Fixation Test مطرح می‌باشد (۱). این امر بدلیل

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

سرو تاپ جدا شده	O <sub>1</sub>	A <sub>22</sub>	SAT <sub>1</sub> (1)	A <sub>22</sub> , O <sub>1</sub>	Asia I	A <sub>87</sub>	A <sub>96</sub> (2)
سال شیوع	۱۹۵۵	۱۹۶۰	۱۹۶۲	۱۹۶۴	۱۹۵۷	۱۹۸۷	۱۹۹۶

۱- از سال ۱۹۶۲ تا کنون 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.



جدول ۳- نتایج بررسی نمونه‌های (ICCSF) که در تیره سلولی BHK-21 علامت CPF را نشان داده‌اند در آزمون CF<sub>2</sub>T.

تعداد کل نمونه‌ها	نمونه‌های ICCSF که در BHK-21 تولید CPF نموده‌اند		تعداد کل نمونه‌ها	آزمون CF <sub>2</sub> T
	مثبت	منفی		
۱۰۰	۷۸	۰	مثبت	مثبت
	۰	۲۲	منفی	

سوسپانسیون، محیط کشت نگهدارنده (GMEM + 2%FBS) به سلول افزوده و برای مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه 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 درصد CPE نشان داده بودند جمع آوری و بعد از سانتریفیوژ نمودن جهت آزمون‌های بعدی در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردیدند.

**مراحل انجام آزمون:** سوسپانسیون حاوی ویروس به منظور شناسایی حضور ویروس تب برفکی با آزمون‌های الایزا و ثبوت عناصر مکمل (CF<sub>1</sub>T) 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<sub>2</sub>T) نیز پروسس شدند.

### نتایج

در مجموع تعداد ۱۰۰ نمونه اپی تلیوم دهان با استفاده از CF<sub>1</sub>T، الایزا و کشت سلولی BHK-21 مورد ارزیابی قرار گرفتند، به طوری که از ۷۸ نمونه (۷۸ درصد)، 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 (۶۴ درصد) 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<sub>1</sub>T) در شناسایی حضور ویروس در نمونه اپی تلیوم دهان ارزیابی گردید. تمامی نمونه‌های که در آزمون ثبوت عناصر مکمل مثبت بودند در آزمون الایزا نیز مثبت بودند، به جز ۴ نمونه که همگی آنها O<sub>1</sub> بودند. تمامی نمونه‌های که در آزمون ثبوت عناصر مکمل و الایزا مثبت بودند در کشت سلولی نیز مثبت تشخیص داده شدند.

تعداد ۵۰ نمونه از ۷۸ نمونه (۶۴ درصد) و تعداد ۲۹ نمونه از ۷۸ نمونه (۳۷ درصد)، به ترتیب در آزمون‌های CF<sub>1</sub>T و الایزا، منفی کاذب تشخیص داده شدند (جدول ۲). ویروس در دو نمونه از ۲۶ نمونه که در آزمون CF<sub>1</sub>T 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 ۲- نتایج آزمون نمونه‌های اپی تلیوم دهان برای ویروس تب برفکی با استفاده از آزمون CF<sub>1</sub>T و الایزا در مقایسه با روش جداسازی ویروس با استفاده از خط سلولی BHK-21.

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

استریل در شرایط محیطی هود میکروبیولوژی کلاس II کاملاً تکه تکه می‌گردید. بافر PBSA به نسبت ۱:۵ به عنوان محلولی که بافت اپی تلیوم زبان در آن معلق می‌گردید مورد استفاده قرار گرفت. مایع روئی بدست آمده بعد از سانتریفیوژ، که بافر حاصل از بافت اپی تلیوم زبان سلاویه شده بود، به عنوان 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 ۱۰ درصد با PBSA و افزودن آنتی بیوتیک جهت کشت سلولی در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره سازی 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، پربرایت انگلستان تهیه گردیدند. این کیت‌ها دارای معرف‌های لازم جهت شناسایی سه سویه آنتی ژن A, O<sub>1</sub>, Asia1 بودند. نوع آزمون الایزا «غیر مستقیم ساندویچی» می‌باشد. سوسپانسیون حاوی ویروس بدست آمده از سلاویه نمونه مرضی به عنوان 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 ۵ درصد 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 حدود ۸۰ درصد 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 ۳۷ درجه سانتیگراد انجام پذیرفت و سپس بعد از تخلیه



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

ماه	استان	سروتیپ <sup>(۱)</sup> A <sub>87</sub>	سروتیپ O <sub>1</sub>	سروتیپ Asia1	نامشخص A/O <sub>1</sub>	تعداد کل
۱۵/۱/۷۹ الی ۳۱/۱/۷۹	اردبیل	۲	۲	-	۱	۷
	خراسان	۱	-	-	-	
	کردستان	۱	-	-	-	
اردیبهشت ۷۹	قم	-	۱	-	-	۱۴
	قزوین	۱	-	-	-	
	تهران	-	۳	-	-	
	آذربایجان غربی	۲(S) <sup>(۲)</sup>	۲	-	-	
	کردستان	۱	-	-	-	
	گلستان	-	۳	-	-	
	خوزستان	۱	-	-	-	
تیر ۷۹	آذربایجان غربی	۱	۳	-	-	۲۲
	آذربایجان شرقی	-	۱	۱	۱	
	کردستان	-	۱	-	-	
	اردبیل	۲	۲	-	۲	
	تهران	-	۳	-	۱	
	سمنان	-	-	-	۱	
	خراسان	۱(S)	-	۱	-	
مرداد ۷۹	آذربایجان شرقی	۱	-	-	-	۱۴
	آذربایجان غربی	۲(S)	-	۱	-	
	اصفهان	۴(S) <sup>(۳)</sup>	-	-	-	
	تهران	۲	-	-	-	
	قم	-	۲	-	-	
شهریور ۷۹	کردستان	۲(S)	-	-	-	۱۴
	تهران	۴	۶	-	-	
	خراسان	۱(S)	۱	-	-	
	اصفهان	-	۱	-	-	
	فارس	۱	-	-	-	
مهر ۷۹	مرکزی	-	۱(S)	-	-	۶
	خراسان	-	۱(S)	-	-	
	کردستان	-	۱	-	-	
	تهران	-	۱	-	-	
	فارس	-	۱	-	-	
آبان ۷۹	آذربایجان غربی	۱	-	-	-	۵
	تهران	۳	-	-	۱	
آذر ۷۹	مرکزی	-	۱	-	-	۵
	تهران	۲	۱	-	-	
دی ۷۹	آذربایجان شرقی	۱	۱	-	-	۶
	فارس	-	۲(S)	۲	-	
	قزوین	۱	-	-	-	
بهمن ۷۹	مرکزی	-	۱(S)	-	-	۳۲
	فارس	-	۲	۴	۲	
	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	-	-	-		
اسفند ۷۹	ایلام	-	۱	-	-	۲۴
	آذربایجان شرقی	-	۱	-	-	
	کرمان	-	-	۲	-	
	سمنان	-	-	۴	-	
	فارس	-	۲	-	-	
	قم	-	۴	۲	-	
	تهران	-	-	۱	-	
	اصفهان	-	-	۴	-	
فروردین ۸۰	قزوین	-	-	۱	-	۳
	تهران	-	-	۳	-	
جمع کل	خراسان	-	-	۲	-	۱۵۲
	قم	۳۸	۶۵	۳۶	۱۲	

۱- سروتایپ A<sub>87</sub> برای اولین بار از ناحیه مردآباد در استان تهران در سال ۱۹۸۷ جدا گردید. ۲- تمامی نمونه‌های دریافتی از گاو می‌باشند بجز آنهایی که با علامت (Sheep) S مشخص گردیده‌اند. ۳- تنها سروتایپ A<sub>87</sub> جدا شده در این سال.



انجام کشت سلولی، با توجه به کوتاه بودن فاصله زمانی بین اخذ نمونه و انجام آزمون در ایران، می‌باشد. 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 رامی توان افزایش داد. همچنین عدم در دسترس بودن محیط مخصوص حمل و نقل نمونه تب برفکی در ادارات دامپزشکی می‌تواند 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 ویروس‌های تب برفکی در ۲۰ درصد و ۶۴ درصد به ترتیب با آزمون‌های CF<sub>1</sub>T و الیزا، بر روی نمونه‌هایی که با کشت سلول قبلاً مثبت شده بودند، نیز مثبت تشخیص داده شدند. میزان یا درصد شناسائی ویروس در نمونه‌های مرضی با آزمون CF<sub>2</sub>T، ۳۰ درصد، به میزان ۵ درصد بیشتر از نتایج بدست آمده توسط آزمایشگاه پربرایت (۲۵ درصد) (۴) و به میزان ۶ درصد بیشتر از نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر (۲۶ درصد) (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، می‌باشد (۶).

در این مطالعه آزمون الیزا حداقل ۲ برابر حساس تر از آزمون CF<sub>1</sub>T، 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 به عنوان 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 الیزا در دسترس نمی‌باشد می‌تواند کاربرد مطلوبی داشته باشد.

بالترین 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 مدیرانه 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 به علت وضعیت جغرافیائی و اجتماعی دامپروری و بازار مصرف محصولات دامی منحصر به

مکمل (CF<sub>2</sub>T) 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 نمی‌باشد (جزئیات نتایج نشان داده نشده است). همچنین تعداد ۲۲ نمونه منفی در کشت سلولی 21-BHK نیز در آزمون ثبوت عناصر مکمل منفی بودند.

توزیع سرو تایپ‌های ویروس تب برفکی بر روی ۳۷۲ نمونه اپی تلیوم دهان ارسالی از سراسر ایران، با استفاده از آزمون ثبوت عناصر مکمل (CF<sub>1</sub>T) در جداول ۴ و ۵ خلاصه شده‌اند. تعداد ۱۵۱ نمونه (۴۰ درصد) از ۳۷۲ نمونه ارسالی نسبت به حداقل یک سرو تایپ 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 (۳۲ عدد) و در اسفند ۷۹ (۲۱ عدد) و حداقل نمونه‌ها در آذر ماه (۲ عدد) به مرکز تشخیص ارسال شدند. فراوانی نوع سرو تایپ‌های جدا شده، در طی این مطالعه، به ترتیب O<sub>1</sub> با ۴۳ درصد، A با ۲۵ درصد، Asia 1 با ۲۴ درصد و سرو تایپ‌های A/O<sub>1</sub> با ۸ درصد 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 می‌باشد 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 داشته‌اند.

## 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 الیزا، 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 الیزا 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 طوری که تعداد ۷۸ نمونه (۷۸ درصد) در روش کشت سلولی مثبت گزارش شدند. شناسائی و جداسازی ویروس تب برفکی در سیستم کشت سلولی در این مطالعه (۷۸ درصد) قابل مقایسه با مطالعه مشابه در پربرایت (۷۰ درصد) 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 ویروس‌های زنده در نمونه‌های مرضی در زمان



## 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 enzyme linked immunosorbent assay,

فرد خود به عنوان مرکز جمع آوری و انتشار بیماریها و بخصوص بیماریهای ویروسی در ایران مطرح بوده است، به طوری که 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 پروندو سرکار خانم مریم بهجتی اردکانی صمیمانه قدردانی نمایند.

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.<sup>1-2\*</sup>, Mahmoudan, N.<sup>1-3</sup>, Kiani, G.A.<sup>1</sup>, Sedigh-Moghadam, R.<sup>1</sup>, Hassan-Zadeh, R.<sup>1</sup>, Moazami, L.<sup>1</sup>,  
Roostae, M.H.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central Veterinary Laboratory, Iranian Veterinary Organization, Tehran-Iran.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid-Beheshti University, Tehran-Iran.

<sup>3</sup>Department of Virology, Tarbiat Modarres University, Tehran-Iran.

(Received 2 May 2005 , Accepted 18 March 2007)

---

## Abstract:

The aim of the present study was to compare three different methods for detection of foot and mouth disease virus antigens (A, Asia1, O1) from mouth epithelium samples and also to monitor 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

