مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۴، ۴۹۰- ۴۸۳
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2019.231843.2615

بررسی آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان با روش Real Time PCR Taqman در چهار استان منتخب ایران

آرش تازیکه[۱] افشین رئوفی[۱] امید مددگار[۲] حسام الدین اکبرین[۳] علیرضا قدردان مشهدی[۴]

[۱]گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲]گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳]گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۴]گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۲۸ فروردین ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۱۵ مرداد ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: عفونت‌های حاصل از هرپس ویروس‌ها در جمعیت تک سمیان در تمامی مناطق دنیا پراکنده بوده و از میان آن‌ها، هرپس ویروس‌های تیپ ۴ تک سمیان یکی از مهمترین علل خسارت‌های اقتصادی در صنعت پرورش اسب هستند. آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان عمدتاً منجر به بیماری تنفسی می‌شود.

هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی شیوع هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان در میان اسب‌های با نشانه‌های بالینی یا سابقه بالینی مرتبط با این ویروس در ۴ استان کشور با حساس‌ترین روش موجود یعنی روش Real Time PCR تکنیک Taqman می‌باشد.

روش کار: نمونه‌های خون و سواب بینی از تعداد ۱۵۰ رأس اسب با نشانه‌های بالینی یا سابقه بالینی مرتبط با این ویروس از ۴ استان گلستان، خوزستان، تهران و آذربایجان غربی اخذ گردید. DNA نمونه‌ها استخراج شد و سپس با روش Real Time PCR Taqman پیشنهادی سازمان OIE از جهت وجود این ویروس مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: از مجموع ۱۵۰ رأس اسب نمونه‌گیری شده، ۱۸ راس (۱۲٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مثبت بودند. از نمونه‌های خون ۷ مورد (۴/۶٪) و از نمونه‌های سواب بینی ۱۱ مورد (۷/۳٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مثبت بودند. از ۴۷ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان گلستان، ۴۵ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان خوزستان، ۳۷ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان تهران و ۲۱ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان آذربایجان غربی به ترتیب ۶ راس (۱۲/۷۶٪)، ۳ راس (۶/۶٪)، ۵ راس (۱۳/۵٪) و ۴ راس (۱۹/۰۴٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مثبت بودند.

نتیجه گیری نهایی: مطالعه حاضر وجود این ویروس را در اسب‌های ۴ استان کشور با روشی حساس و ویژه تأیید نمود و بنابراین توجه به برنامه‌های کنترل و پیشگیری در مورد انتشار این ویروس باید مد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسب، هرپس ویروس تیپ ۴، Taqman ، Real Time PCR

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۶۴-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: raoofi@ut.ac.ir

How to Cite This Article

Tazikeh, A., Raoofi, A., madadgar, O., Akbarein, H., Ghadrdan-Mashhadi, A. (2019). A Survey of Equine Herpes Virus 4 Infection in Four Provinces of Iran Using Real Time PCR Taqman Assay, Iran. J Vet Res, 73(4), 483-490. doi: 10.22059/jvr.2019.231843.2615

مقدمه

امروزه اسب و صنعت اسب داری در کشور ما به شکل روزافزون در حال پیشرفت می‌باشد، بنابراین افزایش موارد بروز بیماری‌های مختلف در این صنعت دور از انتظار نیست. از جمله بیماری‌های با اهمیت در تک سمیان، بیماری‌های عفونی ویروسی می‌باشند که از میان آن‌ها هرپس ویروس‌ها به دلیل گستردگی جهانی و فراوانی بیماری‌هایی که ایجاد می‌کنند از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین پاتوژن‌های تهدید کننده سلامت تک سمیان هستند (۲۰).

عفونت‌های حاصل از هرپس ویروس‌ها در جمعیت تک سمیان در تمامی مناطق دنیا پراکنده می‌باشند و از میان آن‌ها، هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ تک سمیان مهمترین علت خسارات اقتصادی در صنعت تک سمیان می‌باشند (۱،۲،۲۳). هر دوی این ویروس‌ها دارای DNA دو رشته‌ای خطی متعلق به تحت خانواده آلفاهرپس ویرینه و جنس واریسلوویروس هستند (۱،۱۷،۱۸). مشابه دیگر اعضای آلفاهرپس ویروس‌ها، هرپس ویروس تیپ ۱ و ۴ تک سمیان از نظر ژنتیکی و آنتی ژنیکی بسیار به هم شبیه هستند (۳). آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان عمدتاً منجر به بیماری تنفسی (Rhino pneumonitis) می‌شود و به ندرت منجر به سقط جنین، بیماری عصبی و مرگ و میر نوزادان نیز می‌شود (۱،۲). نشانه‌های بالینی ناشی از ابتلا به این ویروس شامل: تب، سرفه، ترشح از بینی و کونژونکتیویت می‌باشد. خسارت اقتصادی ناشی از ابتلا به این ویروس به علت ابتلا تعداد زیاد تک سمیان، از دست دادن زمان تمرین، از دست دادن شانس شرکت در مسابقه‌ها و قرنطینه اسبداری و منطقه و لغو مسابقات می‌باشد (۴).

از جنبه‌های مهم در اپیدمیولوژی هرپس ویروس‌ها وجود حالت نهفتگی و فعال شدن متناوب این ویروس‌ها است. این ویروس‌ها می‌توانند به شکل نهفته در حیوان میزبان درآیند و به دنبال فعال شدن مجدد از میزبان بدون علامت منجر به انتشار عامل بیماری به حیوانات سالم حساس شوند (۲،۳،۸،۱۷) بنابراین نیاز مبرم به یک روش حساس و ویژه که امکان تشخیص سریع بیماری بالینی و همچنین مراقبت از جمعیت‌های حساس را فراهم کند، وجود دارد (۱۰).

روش‌های مختلفی برای تشخیص و تفریق هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و۴ تک سمیان در جمعیت تک سمیان استفاده می‌شوند که عبارتند از: PCR، جداسازی ویروس، سرولوژی و Real Time PCR.

Real Time PCR یک روش حساس، ویژه، سریع و کمی در جهت تشخیص و مراقبت بیماری هرپس ویروس تک سمیان می‌باشد. دقت و حساسیت روش Taqman در صدر روش‌های تشخیصی می‌باشد (۶،۱۰،۲۲).

این مطالعه، نخستین پژوهش در مورد حضور هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان با استفاده از روش Real Time PCR تکنیک Taqman روی نمونه‌های خون و سواب به دست آمده از اسب‌های با نشانه‌های بالینی یا سابقه بالینی مرتبط با این ویروس در ایران می‌باشد.

هدف از این مطالعه ارزیابی شیوع هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان در اسب‌های دارای سابقه یا نشانه بالینی مرتبط با این ویروس در ۴ استان منتخب گلستان، خوزستان، تهران و آذربایجان غربی که دارای جمعیت اسب قابل توجهی در کشور هستند، با روش Real Time PCR تکنیک Taqman می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌ها: نمونه‌های خون و سواب بینی از تعداد۱۵۰ رأس اسب (از هر دو جنس، هر نژاد و هر سنی) با نشانه‌های بالینی یا سابقه بالینی مرتبط با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان (شامل سرفه، ترشحات از بینی، دپرسیون، افزایش تعداد تنفس، تب، نشانه‌های عصبی و سقط جنین) از اسبداری‌های ۴ استان گلستان، خوزستان، تهران و آذربایجان غربی در فاصله زمانی بهمن ماه ۱۳۹۴ تا آذر ماه ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد.

تعداد نمونه اخذ شده از هر استان عبارت بودند از: گلستان ۴۷ نمونه، خوزستان ۴۵ نمونه، تهران ۳۷ نمونه و آذربایجان غربی ۲۱ نمونه.

نمونه‌های خون از ورید وداج به مقدار ۵ ml در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع آوری شد.

سواب‌های بینی اخذ شده به ۱ ml محیط حمل ویروس شامل PBS، پنی سیلین (۸۰۰IU/ml)، استرپتومایسین (۸ml/µg) و ۰/۱٪ (w/v) سرم جنین گوساله، منتقل می‌شد. نمونه‌ها در کنار یخ و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل می‌شدند (۱۰).

نمونه‌های خون با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شدند و سپس قسمت بافی‌کوت آن‌ها توسط پیپت پاستور جدا شده و در ۷۰°C- تا زمان انجام بررسی با Real Time نگهداری می‌شدند (۲).

سواب‌های بینی همراه با محیط حمل ویروس در ۷۰°C- تا زمان انجام Real Time نگهداری می‌شدند.

استخراج اسید نوکلئیک: DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت MBST استخراج شدند. بنا به توصیه شرکت سازنده، DNA از ۱۰۰ µl خون و محیط حمل سواب‌ها طی یک فرآیند ۱۰مرحله‌ای استخراج شدند. کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز و اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ nm تأیید شدند.

Real Time PCR Taqman: سویه مرجع استفاده شده در این مطالعه DNA خالص شده از سویه مرجع جهانی TH۲۰P هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان بود (۱۱).

Real Time PCR روی DNAهای استخراج شده از بافی کوت نمونه‌های خون و سواب‌های بینی انجام شد. گلیکوپروتئین B اعضای تحت

جدول ۱. پرایمرها و پروب برای انجام Real Time PCR.

پرایمرها و پراب	توالی(´۳-´۵)
EHV ۴ Forward	TAG-CAA-ACA-CCC-ACT-AAT-AAT-AGC-AAG
EHV ۴ Reverse	GCT-CAA-ATC-TCT-TTA-TTT-TAT-GTC-ATA-TGC
EHV۴ probe	{JOE}CGG-AAC-AGG-AAC-TCA-CTT-CAG-AGC-CAG-C{BHQ۱}

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین توالی.

پرایمرها	توالی(´۳-´۵)	موقعیت
FC۲	CTTGTGAGATCTAACCGCAC	۱۷۵۶-۱۷۳۷
RC	GGGTATAGAGCTTTCATGGG	۲۸۹۲-۲۹۱۱
FC۳	ATACGATCACATCCAATCCC	۲۰۲۲-۲۰۰۳
R۴	CCTGCATAATGACAGCAGTG	۲۶۶۰-۲۶۷۹

خانـواده آلفا هرپس ویرینه جزیی از لیگاند ایـن ویروس‌ها بوده که حاوی توالی‌های بسـیار اختصاصی گونه‌ها اسـت و تفریق هرپس ویروس‌های تیپ ۱و ۴ تک سـمیان را که بسیار شبیه هم می‌باشند، امکانپذیر می‌سازد (۵). پرایمرها و پروب مورد اسـتفاده در این مطالعه که گلیکوپروتئین B را هدف قرار می‌دهند پیشنهاد سـازمان OIE هستند (جدول ۱). پرایمرهای مورد استفاده برای سکانس موارد مثبت از مطالعه Kirisawa و همکاران در سـال۱۹۹۳ اخذ شـد (۱۲) (جدول ۲). اختصاصی بودن پرایمرها و پروب توسط پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد تایید قرار گرفت. پرایمرها و پروب مورد استفاده توسط شرکت سیناکولون مورد سنتز قرار گرفتند.

Real Time PCR در یک واکنش ۲۰ µl شـامل ۱ µl dNTP ، ۰/۸ Mgcl۲ ، ۰/۳ µl Taq DNA polymerase ، ۲µl بافـر، ۰/۳ µl پـروب، ۰/۶ µl پرایمر فوروارد، ۰/۶ µl پرایمر ریـورز، ۹/۴ µl آب مقطر و ۵ µl از DNA اسـتخراج شده انجام شـد. Real Time PCR در دستگاه Rotor-Gene (QIAGEN, Geramany) تحـت شـرایط دمایـی زیر انجام شد.

فـاز جدا شـدن اولیه در دمـای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، سـیکل‌های گرمایی به صورت ۴۰ سیکل ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰°C به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد (۲۲).

تفسیر نتایج بر اساس مقادیر Ct به دست آمده صورت پذیرفت (مقادیر Ct برابر ۳۵ و کمتر از آن مثبت و مقادیر بیشتر از ۳۵ منفی در نظر گرفته شد) (۵).

دو نمونه مثبت، برای تأیید نتایج، تعیین توالی شـدند. شـرایط PCR Nested انجام شده برای تعیین توالی به قرار زیر است.

فاز جدا شـدن اولیه در دمای ۹۴°C برای مدت ۵ دقیقه، سـیکل‌های گرمایی به صورت ۳۰ سـیکل ۹۴°C به مدت ۱ دقیقـه، ۵۳°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه، فاز پایانی به صورت ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه.

پس از پایان واکنش، محصول PCR که اندازه باند آن ۶۸۸ بود، از ژل اسـتخراج و برای تعیین توالی ارسال گردید و پس از تعیین توالی در بانک ژن جهانی BLAST شد.

نتایج

از مجموع ۱۵۰رأس اسـب نمونه‌گیری شـده، ۱۸ راس (۱۲٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مثبت بودند. از نمونه‌های خون ۷ مورد (۴/۶ ٪) و از سواب‌های بینی ۱۱ مورد (۷/۳ ٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مثبت بودند. از ۱۸ مورد مثبت از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان به ترتیب ۱۴ (۷۷/۷۷ ٪)، ۲ (۱۱/۱۱ ٪)،۱ (۵/۵ ٪) و ۱ (۵/۵٪) مورد دارای نشـانه‌های بالینی یا سابقه بالینی بیماری‌های تنفسی، سقط جنین، بیماری عصبی و بیماری توام (تنفسی و سقط جنین) بودند (جدول ۳).

از ۴۷ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان گلستان ۶ مورد (۲/۷۶ ٪) و از ۴۵ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان خوزستان ۳ مورد (۶/۶٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مثبت بودند. از ۳۷ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان تهران ۵ مورد (۱۳/۵٪) و از ۲۱ رأس اسب نمونه‌گیری شده از اسـتان آذربایجان غربی ۴ مورد (۱۹/۰۴٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مثبت یافت شدند (جدول ۳). نتایج نشان می‌دهند که آذربایجان غربی بیشترین و خوزستان کمترین میزان آلودگی را دارند.

از ۱۸ رأس اسب آلوده با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان، ۱۳ راس (۱۴/۹۴٪) مادیان و ۵ راس (۷/۹۳٪) نریان بودند (جدول ۳).

از ۱۸ رأس اسـب آلوده با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان، ۸ راس (۲۱/۶۲٪) از نـژاد آمیختـه، ۲ راس (۱۲/۵٪) از نـژاد KWPN، ۳ راس (۶/۵٪) از نـژاد عرب، ۲ راس (۱۲/۵٪) از نـژاد تروبرد، ۲ راس (۸٪) از نژاد ترکمن و ۱ راس (۱۰٪) از نژاد هلشتاین بودند (جدول ۴).

از ۱۸ مورد هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان یافت شده از ۱۵۰ نمونه اخذ شده، ۲ نمونه (۷/۱٪) مربوط به اسب‌های ۵-۱ سال، ۷ نمونه (۱۳/۲٪) متعلق به اسـب‌های ۱۰-۶ سـال و ۹ نمونه (۱۷/۳٪) مربوط به اسب‌های ۱۵-۱۱ سال بودند (جدول ۵).

جدول ۳. توزیع فراوانی یافته‌های بالینی، سن، جنس و استان اسب‌های آلوده به هرپس ویروس تیپ ۴ تک‌سمیان آ.غ: آذربایجان غربی.

ردیف	یافته بالینی	سن (سال)	جنس	استان	خون	سواب بینی
۱	تنفسی-سابقه	۶	مادیان	گلستان	-	+
۲	تنفسی-سابقه	۶	مادیان	گلستان	+	-
۳	تنفسی-سابقه	۱۲	مادیان	گلستان	+	-
۴	تنفسی-سابقه	۷	مادیان	تهران	+	-
۵	تنفسی-سابقه	۱۰	مادیان	تهران	+	-
۶	تنفسی-نشانه	۱۲	نریان	تهران	-	+
۷	تنفسی-نشانه	۱۲	نریان	تهران	-	+
۸	تنفسی-سابقه	۹	نریان	آ.غ	+	-
۹	تنفسی-سابقه	۶	نریان	آ.غ	+	-
۱۰	تنفسی-سابقه	۱۱	مادیان	آ.غ	-	+
۱۱	تنفسی-سابقه	۱۲	مادیان	آ.غ	-	+
۱۲	تنفسی-نشانه	۴	مادیان	خوزستان	-	+
۱۳	تنفسی-سابقه	۱۳	نریان	خوزستان	-	+
۱۴	تنفسی-سابقه	۱۵	مادیان	خوزستان	-	+
۱۵	سقط-سابقه	۱۱	مادیان	گلستان	-	+
۱۶	سقط-سابقه	۱۵	مادیان	گلستان	-	+
۱۷	عصبی-نشانه	۸	مادیان	تهران	+	-
۱۸	سقط و تنفسی-سابقه	۴	مادیان	گلستان	-	+

بحث

این مطالعه، نخستین پژوهش با روش Real Time PCR تکنیک Taqman روی نمونه‌های خون و سواب بینی اسب‌های کشور در جهت تشخیص هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان می‌باشد.

Real Time PCR به علت داشتن سرعت، حساسیت و ویژگی در جهت تشخیص این ویروس و توانایی تفکیک آن از هرپس ویروس تیپ ۱ تک سمیان مورد استفاده قرار گرفته است (۲۲، ۱۸، ۱۰، ۶). در تکنیک Taqman به علت استفاده از پروب‌های انحصاری ارگانیسم مربوطه، امکان اشتباه وجود نداشته و از بالاترین حساسیت، دقت و ویژگی برخوردار است. نمونه‌های به کار گرفته شده در این مطالعه از اسب‌داری‌های مختلف از ۴ استان کشور که جمعیت اسب قابل توجهی دارند اخذ شد، اسب‌های موجود دراین اسب‌داری‌ها به منظور اهدافی از قبیل مسابقات پرش و سرعت، تولید مثل و آموزش سوارکاری نگهداری می‌شدند.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که از مجموع ۱۵۰ رأس اسب نمونه‌گیری شده ۱۸ مورد (۱۲٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مثبت بودند و از نمونه‌های خون اخذ شده ۷ مورد (۴/۶٪) و از سواب‌های بینی ۱۱ مورد (۷/۳٪) از نظر این ویروس مثبت بودند.

تحقیقات متعددی در مورد هرپس ویروس‌های تک سمیان در مناطق مختلف دنیا صورت گرفته و نتایج متفاوتی بر اساس مناطق مختلف جغرافیایی و روش‌های آزمایشگاهی استفاده شده، به دست آمده است (۲،۱۴،۲۲). اگر چه مطالعه حاضر، وجود هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان را در اسب‌های دارای نشانه‌های بالینی یا سابقه بالینی مرتبط با این ویروس نشان داده است اما نمی‌توان امکان ابتلا با دیگر پاتوژن‌ها را به عنوان عامل بیماری بالینی رد نمود.

به طور کلی همراه شدن نشانه‌های بالینی با حضور ویروس در خون بیانگر مرحله ویرمی ویروس و حضور عفونت فعال است، در حالت دیگر همراه شدن نشانه‌های بالینی با حضور ویروس در سواب بینی و عدم تشخیص ویروس در خون باز هم بیانگر وجود عفونت فعال است اما به علت کوتاه بودن فاز ویرمی در مورد هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان امکان تشخیص آن در خون به علت تعداد بسیار کم ویروس وجود ندارد. اسب‌هایی که دارای سابقه بالینی مرتبط با این ویروس بودند و در زمان نمونه برداری فاقد نشانه‌های بالینی بودند حضور ویروس در خون آن‌ها بیانگر حالت نهفتگی ویروس در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی آن‌ها است، از سوی دیگر اسب‌های فاقد نشانه‌های بالینی در زمان نمونه برداری که واجد ویروس در سواب بینی می‌باشند، بیانگر فعال شدن ویروس از حالت نهفتگی و دفع آن از طریق ترشحات بینی است که این اسب‌ها به عنوان منبعی برای انتشار این ویروس به دیگر حیوانات حساس در تماس هستند. اصولاً این ویروس در اسب‌های مبتلا به حالت نهفتگی به دنبال یک استرس مانند حمل و نقل، بیماری، شرکت در مسابقات و یا بدنبال تجویز کورتون‌ها فعال شده و شروع به دفع به محیط اطراف می‌کنند (۴، ۱).

فراوانی آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان در جمعیت تعریف شده برای اسب‌ها در این مطالعه ۱۲٪ به دست آمد که کمتر از

جدول ۴. توزیع فراوانی نژاد در اسب‌های نمونه‌گیری شده.

نژاد	آمیخته	ترکمن	هلشتاین	KWPN	عرب	تروبرد
تعداد اسب‌های نمونه گیری شده	۳۷	۲۵	۱۰	۱۶	۴۶	۱۶
تعداد و درصد اسب‌های آلوده با هرپس ویروس تیپ ۴	۸ (٪۲۱/۶۲)	۲ (٪۸)	۱ (٪۱۰)	۲ (٪۱۲/۵)	۳ (٪۶/۵)	۲ (٪۱۲/۵)

جدول ۵. توزیع فراوانی گروه‌های سنی در اسب‌های نمونه‌گیری شده.

سن (سال)	<۱	۱-۵	۶-۱۰	۱۱-۱۵	>۱۵
تعداد اسب‌های نمونه گیری شده	۵	۲۸	۵۳	۵۲	۱۲
تعداد و درصد اسب‌های آلوده با هرپس ویروس تیپ ۴	۰	۲ (٪۷/۱)	۷ (٪۱۳/۲)	۹ (٪۱۷/۳)	۰

مقادیر گزارش شـده توسـط Momtaz و Hematzadeh در سال ۲۰۰۳ بـه میزان ۶۸/۹۶ ٪ و Sarani و همکاران در سـال ۲۰۱۳ به میزان ۸۸ ٪ می‌باشد. این اختلاف می‌تواند به علت تفاوت در منطقه جغرافیایی شامل: شرایط آب و هوایی (رطوبت، دما، فصل و سایر شاخص‌های اقلیمی)، میزان شیوع عفونت حاصل از هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان و نحوه مدیریت اسبداریها در این مناطق باشد (۷). از دیگر عواملی که می‌تواند علت اختلاف در میزان آلودگی به دسـت آمده در این تحقیقات را توجیه نماید این است کـه مطالعه Momtaz و Hematzadeh در سـال ۲۰۰۳ یک بررسـی سرولوژی بوده است و بر اساس تشخیص آنتی بادی صورت گرفته است و اصولاً اسـب‌هایی که آنتی بادی علیه این ویروس در آن‌ها تشخیص داده می‌شود اما فاقد نشانه‌های بالینی هستند، به عنوان اسب‌های مبتلا به حالت نهفتگی در نظر گرفته می‌شوند و احتمالاً به علت کم بودن ذرات ویروس، در مطالعه مولکولی تشخیص داده نمی‌شوند، حال آنکه آنتی بادی همچنان در خون آن‌ها حضور دارد. از دیگر دلایل تفاوت نتایج می‌تواند اسـتفاده از روش Sybergreen در مطالعه Sarani و همکاران در سال ۲۰۱۳ باشد که دقت و ویژگی کمتری از روش Taqman دارد. در مقایسـه با مطالعه Taktaz و همکاران در سال ۲۰۱۵، باز هم فراوانی بدست آمده در تحقیق حاضر از هرپس ویروس تیپ ۴ تک سـمیان در ۳ اسـتان گلستان، تهران و خوزسـتان کمتر از مقادیر گزارش شده از اصفهان (۱۶/۹۸٪) و شهرکرد (۱۶/۲۱٪) بود، که این مورد هم می‌تواند به علت تفاوت‌های منطقه‌ای باشد که در بالا به آن‌ها اشـاره شـد، اما فراوانی آلودگی این ویروس در اسـتان آذربایجان غربی بیشتر از فراوانی آن در اصفهان و شهرکرد بود. این وضعیت شاید به علت مرزی بودن این استان و درنتیجه تردد غیرقانونی تک سمیان از کشورهای همسایه (عراق و ترکیه) به مرزهای کشور ما، تا حدودی قابل توجیه باشد، به طوری که ممکن است ورود تک سمیان حامل آلوده زمینه را برای انتشار بیشتر آلودگی در جمعیت تک سمیان استان آذربایجان غربی فراهم کند. در مطالعه حاضر کمترین میزان آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان مربوط به استان خوزستان بود، که می‌توان علت این امر را، علاوه بر موارد فوق الذکر، با شرایط اقلیمی و آب و هوای استان خوزستان و حساسیت این ویروس نسبت به گرما نیز مربوط دانست (۱،۷،۱۴).

دربررسـی حاضر مانند مطالعات Taktaz و همکاران در سال ۲۰۱۵، Gohering و همـکاران در سـال ۲۰۰۶ و Henninger و همکاران در سـال ۲۰۰۷، حضور بیشـتر این ویروس در اسب‌های مسن تر جلب توجه می‌کند. در این خصوص به نظر می‌رسـد با افزایش سـن احتمال مواجهه بـا این ویروس افزایش یابد و چون اصولاً اسـب‌های بالغ برای تولیدمثل، مسابقات و تمرین استفاده می‌شوند بنا بر این احتمال مواجهه با ویروس در این گروه از اسب‌ها افزایش می‌یابد (۷،۹،۲۱).

نتایج حاصل از این تحقیق نیز مانند مطالعات Taktaz و همکاران در سـال ۲۰۱۵، Gohering و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Lunn و همکاران در سـال ۲۰۰۹ حاکی از حضور بیشـتر این ویروس در یک نژاد در مقایسه با نژادهای دیگر اسـت. در مطالعه حاضر درصد بیشـتری از اسب‌های نژاد آمیخته به این ویروس آلوده بودند که این می‌تواند به علت استفاده بیشتر از این گروه نژادی در مسابقات باشد و جمع شدن تعداد زیاد اسب در زمان مسـابقات در یک مکان و اسـترس‌های ناشـی از حمل و نقل و مسابقات می‌توانند به عنوان عواملی در جهت انتشار بیشتر ویروس و در نتیجه ثبت موارد مثبت بیشتر در این گروه نژادی باشند (۷،۹،۱۳).

در نهایت مطالعه حاضر وجود هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمیان را که از عوامل اصلی ایجاد بیماری تنفسی در تک سمیان می‌باشد در اسب‌های ۴ استان کشور که دارای جمعیت اسب قابل توجهی هستند با روشی حساس و ویـژه تأیید کرد. با توجه بـه توانایی این ویروس در ایجاد حالت نهفتگی و فعال شـدن مجدد و در نهایت انتشـار آن در بین دام‌های سـالم، به نظر می‌رسد برنامه‌ریزی برای کنترل و پیشگیری از پراکندگی این ویروس که می‌تواند منجر به خسارت‌های قابل توجهی به صنعت پرورش اسب کشور شود، ضروری و اجتناب ناپذیر باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند تا مراتب قدردانی از زحمات دکتر آرش قلیانچی لنگرودی، دکتر علی سارانی و دکتر ایرج اشرافی تمای را به عمل آورند.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Allen, G. P., Kydd, J. H., Slater, J. D., Smith, K. C. (2004). Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. In: Infectious Diseases of Livestock. Coetzer, J. A. w., Tustin, R.C. (eds.). (2nd ed.) Oxford university press. Cape town, South Africa, p. 829-859.
2. Ataseven, V. S., Dağalp, S. B., Güzel, M., Başaran, Z., Tan, M. T., Geraghty, B. (2009). Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. Res Vet Sci, 86(2), 339-344.
3. Carvalho, R., Passos, L. M. F., Martins, A. S. (2000). Development of a differential multiplex PCR assay for equine herpesvirus 1 and 4 as a diagnostic tool. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 47(5), 351-359.
4. Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., Grunberg, W. (2017). Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. (11th ed.) Elsevier. Melbourne, Australia. p. 1040-1042.
5. Diallo, I. S., Hewitson, G., Wright, L., Rodwell, B. J., Corney, B. G. (2006). Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. J Virol Methods, 131(1), 92-98.
6. Diallo, I. S., Hewitson, G., Wright, L. L., Kelly, M. A., Rodwell, B. J., Corney, B. G. (2007). Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). Vet Microbiol, 123(1), 93-103.
7. Goehring, L. S., Winden, S. C., Maanen, C. V., Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. S. (2006). Equine Herpesvirus Type 1-Associated Myeloencephalopathy in The Netherlands: A Four-Year Retrospective Study (1999–2003). J Vet Intern Med, 20(3), 601-607.
8. Harless, W., Pusterla, N. (2006). Equine herpesvirus 1 and 4 respiratory disease in the horse. Clin Tech Equine Pract, 5(3), 197-202.
9. Henninger, R. W., Reed, S. M., Saville, W. J., Allen, G. P., Hass, G. F., Kohn, C. W., Sofaly, C. (2007). Outbreak of Neurologic Disease Caused by Equine Herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. J Vet Intern Med, 21(1), 157-165.
10. Hussey, S. B., Clark, R., Lunn, K. F., Breathnach, C., Soboll, G., Whalley, J. M., Lunn, D. P. (2006). Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest, 18(4), 335-342.
11. Kawakami, Y., Kaji, T., Ishizaki, R., Shimizu, T., Matumoto, M. (1962). Etiologic study on an outbreak of acute respiratory disease among colts due to equine rhinopneumonitis virus. Jpn J Exp Med, 32, 211-229.
12. Kirisawa, R., Endo, A., Iwai, H., Kawakami, Y. (1993). Detection and identification of equine herpesvirus-1 and-4 by polymerase chain reaction. Vet Microbiol, 36(1-2), 57-67.
13. Lunn, D. P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M. J. B. F., Horohov, D. W., Osterrieder, K., Pusterla, N., Townsend, H. G. G. (2009). Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. J Vet Intern Med, 23(3), 450-461.
14. Matsumura, T., Suciura, T., Imagawa, H., Fukunaga, Y., Kamada, M. (1992). Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. J Vet Med Sci, 54(2), 207-211.
15. Momtaz, H., Hematzadeh, F. (2003). A Serological survey on equine herpes virus 1 and equine herpes virus 4 in the horse using ELISA. Pajouhesh Va Sazandegi, (In Persian) 59, 63–69.
16. OIE Terrestrial Manual. (2015). Equine rhinopneumonitis (Equine herpes virus 1 and 4). Chapter, 2.5.9, 1-13.
17. Patel, J. R., Heldens, J. (2005). Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)–epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. Vet J, 170(1), 14-23.
18. Pusterla, N., Hussey, S. B., Mapes, S., Leutenegger, C. M., Madigan, J. E., Ferraro, G. L., Lunn, D. P. (2009). Comparison of four methods to quantify equid herpesvirus 1 load by real-time polymerase chain reaction in nasal secretions of experimentally and naturally infected horses. J Vet Diagn Invest, 21(6), 836-840.

19. Sarani, A., Mohammadi, G., Mayameei, A., Akbari, M. (2013). Investigation of equine herpesvirus-1 and 4 infections in equine population of Iran by real-time PCR. Hum Vet Med, 5(1), 29-33.
20. Taghipour Bazargani, T., Momtaz, H., Baharlo, F.R., Ghafari, M. (2014). The first report of myloencephalopathy caused by equine herpes virus type 1 in Iran. Iran Vet J, 23; 10(3):100-3.
21. Taktaz Hafshejani, T., Nekoei, S., Vazirian, B., Doosti, A., Khamesipour, F., Anyanwu, M. U. (2015). Molecular detection of equine herpesvirus types 1 and 4 infection in healthy horses in Isfahan central and Shahrekord southwest regions, Iran. Biomed Res Int, 2015, 1-7.
22. Turan, N., Yildirim, F., Altan, E., Sennazli, G., Gurel, A., Diallo, I., Yilmaz, H. (2012). Molecular and pathological investigations of EHV-1 and EHV-4 infections in horses in Turkey. Res Vet Sci, 93(3), 1504-1507.
23. Varrasso, A., Dynon, K., Ficorilli, N., Hartley, C. A., Studdert, M. J., Drummer, H. E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. Aust Vet J, 79(8), 563-569.

Original Article

Journal of Veterinary Research
J. Vet. Res. 73,4: 483-490, 2018

A Survey of Equine Herpes Virus 4 Infection in Four Provinces of Iran Using Real Time PCR Taqman Assay

Arash Tazikeh[1], Afshin Raoofi[1], Omid Madadgar[2], Hesameddin Akbarein[3], Alireza Ghadrdan Mashhadi[4]

[1]*Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

[3]*Department of Food Hygiene Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

[4]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

(Received 17 April 2018, Accepted 6 August 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Herpes virus infections are pervasive in equine populations worldwide, among them equine herpes virus 4 (EHV-4) is one of the major causes of economic losses in equine industry. Infection with equine herpes virus 4 (EHV4) is well recognized as a cause of respiratory disease.

OBJECTIVES: Evaluation of prevalence of the EHV4 in horses with clinical signs or history associated with these viruses from four provinces of Iran using the most sensitive method, Real Time PCR Taqman assay.

METHODES: Blood samples and nasal swabs were taken from 150 horses with clinical signs or history associated with these viruses from four provinces (Tehran, Golestan, West Azarbaijan and Khuzestan) of Iran. DNA of samples extracted were then used for detection by Real Time PCR.

RESULTS: From 150 sampled horses, a total of 18 (12%) were found to be positive for EHV-4. A total of 7 (4.6%) blood samples and 11 (7.3%) nasal swab samples were found to be positive for EHV-4. Out of 47 sampled horses from Golestan province, 45 sampled horses from Khuzestan province, 37 sampled horses from Tehran province and 21 sampled horses from West Azarbaijan, 6 (12.76%), 3 (6.6%), 5 (13.5%) and 4 (19.04%) were positive for EHV-4, respectively.

CONCLUSIONS: This survey confirms the presence of EHV-4 in these provinces of Iran thus consideration should be given to preventive and control programs for dissemination of these viruses.

Keyword:

Equine, Herpes virus 4, Real Time PCR, Taqman

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Real-time PCR primers and probe.

Table 2. Primers used for sequence analysis.

Table 3. Frequency of infected horses with EHV-4 according to clinical signs, age, sex and province.

Table 4. Frequency of breed in sampled horses.

Table 5. Frequency of age in sampled horses.

***Corresponding author's email: raoofi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117164, Fax: 021-66933222**