University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 79, Number 4, 2024, 213-221

Examining the Affinity and Antigenic Changes of Foot-and-Mouth Disease Virus with Vaccinal Viruses in Khorasan Razavi Province from 2021 to 2022

Saeid Zibaee[1]✉, Akbar Khorasani[2]✉, Nasser Morgan Azghadi[3]✉, Maryam Torabi[3]✉, Hamidreza Farzin[1]✉

[1] Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

[2] FMD Vaccine Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

[3] Central Laboratory of General Veterinary Department of Khorasan Razavi Province, Veterinary Organization of Iran, Mashhad, Iran

***Received:** 14 July 2024, **Accepted:** 22 September 2024*

10.22059/JVR.2024.374527.3428

Abstract

BACKGROUND: Foot-and-mouth disease is one of the most important viral diseases affecting livestock. Types O, A, and Asia 1 of the foot-and-mouth virus have been endemic in Iran for a long time.

OBJECTIVES: The current research investigated the molecular epidemiology, affinity, and changes in antigenicity of the foot-and-mouth virus in relation to vaccine viruses in Razavi Khorasan province from 2021 to 2022.

METHODS: In this study, 51 samples taken from suspected animals exhibiting clinical symptoms between 2021 and 2022in the province were analyzed by ELISA, real-time RT-PCR and RT-PCR tests, and cell culture. The affinity of antigenicity of five circulating viruses with the vaccine virus (R-value) produced by the Razi Vaccine Research and Serum Institute was calculated.

RESULTS: The results showed that 34.52% of suspected samples were positive, with 33.33% belonging to sheep and 35.72% belonging to cattle; all samples were type O. By cell culture in 2021, seven samples from cows and two samples from sheep were isolated, while in 2022, five samples from cows and two samples from sheep were isolated. Determining the nucleotide sequence of five samples of the viruses showed that the virus O/IRN/KHO/1/2022 has the most similarity (98.5%) with the virus O/IRN/KHO/3/2022, whereas the virus O/IRN/KHO/7/2022 had the least similarity (90.7%) with the virus O/IRN/KHO/4/2022. Also, the similarity of the nucleic acids of all the isolated viruses with the virus used in the vaccine MN539142.1/O/IRN/93/2016 was more than 87.5% in all five cases, and the antigenic similarity coefficient of the circulating virus with the virus vaccine was greater than 0.3.

CONCLUSIONS: The vaccine from the Razi Vaccine Research and Serum Institute demonstrated the ability to produce protective antibodies and establish the necessary immunity against foot-and-mouth disease viruses circulating in Razavi Khorasan Province between 2021 and 2022.

Keywords: Antigenic, Antigenicity, Foot-and-Mouth disease, Foot-and-Mouth virus, Virus vaccine

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Saeid Zibaee, Tel/Fax: +9851-38431780/ +9851-38420430

How to cite this article:

Zibaee S, Khorasani A, Morgan Azghadi N, Torabi M, Farzin H. Examining the Affinity and Antigenic Changes of Foot-and-Mouth Disease Virus with Vaccinal Viruses in Khorasan Razavi Province from 2021 to 2022. J Vet Res, 2024; 79(4): 213-221. doi: 10.22059/jvr.2024.374527.3428

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The Sequences of the Primers Used to Identify and Determine the Foot-and-Mouth Virus Type by Multiplex Real-Time PCR.

Table 2. The Names of the City, the Year, and the Isolated Animals of the Foot-and-Mouth Virus in 2021 and 2022.

Table 3. The Results of the Similarity of the Nucleic Acids of the Isolated Viruses with Other Viruses Isolated in 2021 and 2022, Including Viruses from Iran and the Region, Whose Nucleic Acid Sequences are Available in the Gene Bank, Analyzed Using MEGA Software.

Graph 1. Phylogenetic diagram of foot-and-mouth viruses isolated from the province in 2021 and 2022, compared with foot-and-mouth viruses from Iran and the region registered in NCBI, created using MEGA software.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۹، شماره ۴، ۱۴۰۳، ۲۲۱-۲۱۳

بررسی قرابت و تغییرات آنتی‌ژنتیکی ویروس تب برفکی با ویروس‌های واکسینال در استان خراسان رضوی در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱

سعید زیبائی[۱]، اکبر خراسانی[۲]، ناصر مرگان‌ازغدی[۳]، مریم ترابی[۳]، حمیدرضا فرزین[۱]

[۱] بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
[۲] بخش تولید واکسن تب برفکی، مؤسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۳] آزمایشگاه مرکزی اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی، سازمان دامپزشکی کشور، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۴ تیرماه ۱۴۰۳ ، **تاریخ پذیرش:** ۱ مهرماه ۱۴۰۳

10.22059/jvr.2024.374527.3428

چکیده

زمینه مطالعه: تب برفکی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی دام است. تیپ‌های O، A و Asia1 ویروس تب برفکی از دیرباز در ایران بومی می‌باشند.

هدف: در مطالعه حاضر اپیدمیولوژی مولکولی، قرابت و تغییرات آنتی‌ژنتیکی ویروس تب برفکی با ویروس‌های واکسینال در استان خراسان رضوی در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ بررسی شد.

روش‌کار: ۵۱ نمونه گرفته‌شده از دام‌های مشکوک دارای علائم بالینی در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱، توسط آزمایش‌های الایزا، Real Time RT-PCR ، RT-PCR و کشت سلولی بررسی شد و قرابت آنتی‌ژنیسیتی ۵ ویروس در گردش با ویروس واکسن (R-value) ساخته‌شده در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی محاسبه گردید.

نتایج: ۳۴/۵۲ درصد از نمونه‌های مشکوک مثبت بود که از این تعداد ۳۳/۳۳ و ۳۵/۷۲ درصد به‌ترتیب متعلق به گوسفند و گاو بود. تمام نمونه‌ها تیپ O بودند و توسط کشت سلولی در سال ۱۴۰۰ تعداد ۷ نمونه گاوی و ۲ نمونه گوسفندی و در سال ۱۴۰۱، ۵ نمونه گاوی و ۲ نمونه گوسفندی جدا شدند. ۵ نمونه تعیین توالی نوکلئوتیدی‌شده ویروس‌ها نشان داد ویروس O/IRN/KHO/1/2022 بیشترین تشابه (۹۸/۵ درصد) را با ویروس O/IRN/KHO/3/2022 و ویروس O/IRN/KHO/7/2022 کمترین تشابه (۹۰/۷ درصد) را با ویروس O/IRN/KHO/4/2022 داشت. همچنین میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک تمام ویروس‌های جداشده با ویروس به‌کاررفته در واکسن O/IRN/93/2016 /MN539142.1 بیشتر از ۸۷/۵ درصد بود و در هر ۵ موردمحاسبه ضریب شباهت آنتی‌ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن بزرگتر از ۰/۳ بود.

نتیجه‌گیری نهایی: واکسن ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی قدرت تولید آنتی‌بادی محافظتی و ایجاد ایمنی لازم در برابر ویروس‌های عامل بیماری تب برفکی در حال گردش در استان خراسان رضوی را طی سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ داشته است.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژنتیکی، آنتی‌ژنیسیته، بیماری تب برفکی، ویروس تب برفکی، ویروس واکسینال

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: *سعید زیبائی، بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران*

مقدمه

تب برفکی دشمن سرمایه دامی و یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی دام می‌باشد (۱). این بیماری به‌شدت واگیردار است و تمام زوج سمان را درگیر کرده و به کاهش تولید شیر (۲۵ درصد)، گوشت (۲۵ درصد) و پشم (۲۵ درصد) در گله منجر می‌شود و ۵ درصد تلفات در دام‌های جوان ایجاد می‌کند. ویروس تب برفکی از خانواده پیکورناویریده و از جنس آفتوویروس است که ۷ تیپ C، O، A، Asia1، SAT1، SAT2، SAT3 و بیش از ۸۵ تحت‌تیپ دارد. تیپ‌های A و O در آفریقا، آسیا و بخشی از آمریکای جنوبی در گردش می‌باشند، درحالی‌که تیپ C ظاهراً

ناپدید شده است (۱). تیپ SAT2 در عراق در سال ۲۰۲۲ به‌طور محدود و همچنین تیپ Asia1 در سال ۲۰۲۱ در پاکستان گزارش شده است (۲، ۳). از دیرباز در ایران تیپ‌های O، A و Asia1 ویروس تب برفکی بومی می‌باشند. ناحیه ژنومی 1D ژن ویروس مسئول صدور رمز برای تولید مهم‌ترین پروتئین آنتی‌ژن سطحی (VP1) است. با مطالعه فعالیت مناطقی از VP1 و نیز تعیین توالی این منطقه در سروتیپ‌های مختلف FMDV معلوم شد بیشترین تغییرات آنتی‌ژنتیکی مربوط به مناطقی از ژنوم ویروس است که اسید آمینه‌های ۱۴۱ تا ۱۶۰ و ۲۰۰ تا ۲۱۳ کد می‌دهد (۴). تنوع بالای ویروس باعث می‌شود کنترل این بیماری ازطریق واکسیناسیون سخت باشد. وجود دام‌های ناقل هم سبب باقی ماندن ویروس در گله می‌شود و کنترل بیماری را دشوار می‌کند. تشخیص اولیه ویروس در نمونه‌های مشکوک توسط آزمایش الایزا انجام می‌شود. همچنین از RT-PCR و Real time PCR برای تشخیص و تعیین تیپ‌های ویروس تب برفکی در آزمایشگاه مرجع جهانی (World Reference Laboratory for FMD, pirbright) استفاده می‌گردد.

باید در نظر داشت درکشورهای همسایه، کشورهایی وجود دارند که نه‌تنها بیماری در آن‌ها بومی است، بلکه بعضاً مبارزه با این بیماری در این کشورها، نظیر افغانستان، با علامت سؤال مواجه است. ترس از بیماری نه‌تنها برای کشورهای اندمیک آزاردهنده می‌باشد، بلکه تهدید احتمال سرایت آن به کشورهای پاک نیز حاشیه امنیت آن‌ها را با خطر مواجه کرده است. چنانچه نگاهی به پدیده بیوتروریسم اقتصادی داشته باشیم، وسعت میدان مبارزه بسیار وسیع‌تر می‌شود. استان خراسان رضوی دارای ۶ میلیون و ۷۰۰ هزار رأس دام سبک و ۳۱۵ هزار رأس دام سنگین است. تعداد دام سنگین روستایی و عشایری استان ۲۰۰ هزار رأس می‌باشد. کسب رتبه نخست کشور در تولید گوشت قرمز (با تولید حدود ۸۳ هزار تن) و مقام سوم در تولید شیر (با تولید بیش از ۱ میلیون و ۱۴۰ هزار تن شیر) نشان از جایگاه این استان در حوزه دام دارد. درصورتی‌که بیماری تب برفکی شیوع پیدا کند و تنها ۵ درصد خسارت اقتصادی ناشی از تلفات، کاهش گوشت و کاهش شیر را در نظر بگیریم، طبق برآورد خسارت اقتصادی ناشی از بیماری در ۱ سال حدوداً ۵۰۲۰ میلیارد ریال خواهد بود. آگاهی از وضعیت ژنتیکی سویه‌های در گردش سبب پیش‌بینی وقوع احتمالی همه‌گیری‌های شدید خواهد شد و یا ممکن است موجب تصمیم‌گیری برای تغییر سویه‌های واکسینال گردد. مطالعه حاضر سویه‌های در گردش مزارع را طی سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ پایش ژنومی کرده و قرابت ژنتیکی ویروس‌های جداشده را با ویروس‌های ثبت‌شده در بانک ژنی و ویروس‌های موجود در واکسن تب برفکی تولیدشده در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بررسی کرده است.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و آماده‌سازی نمونه: ۵۱ نمونه از ضایعات لثه و زبان دام‌های مشکوک توسط دامپزشکان اخذ و داخل بافر فسفات حاوی ۵۰ درصد گلیسرول به آزمایشگاه ارسال شد. جهت آماده‌سازی، نمونه پس از له و ساییده شدن کامل در هاون چینی و هموژن کردن زیر هود کلاس II با شرایط ۳۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد (سوسپانسیون حاوی ویروس مشکوک برای کشت سلولی با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد). مایع رویی یا بلافاصله برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت و یا تا انجام آزمایش داخل فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۵، ۶).

آزمایش الایزا: پس از آماده‌سازی نمونه‌ها طبق دستورالعمل کیت (کیت الایزای تشخیص آنتی‌ژن تب برفکی IZSLER Brescia، ایتالیا) آزمایش ساندویچ الایزای غیرمستقیم انجام شد. متوسط OD هر نمونه پس از کسر OD (Blank) درصورتی‌که عدد ۰/۱ یا بیشتر بود نمونه مثبت تلقی گردید.

جداسازی ویروس: جهت جداسازی ویروس، از سلول کلیه خوک IB-RS-2 استفاده شد. پس از عمل جذب ویروس، برای رشد سلول از محیط کشت سلولی ایگل کامل Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی ۲ درصد سرم جنین استفاده شد. مدت‌زمان انکوباسیون برای کنترل و دیدن CPE برای هر پاساژ ۴۸ ساعت بود. نمونه‌های منفی تا ۳ پاساژ کشت داده شدند (۷).

بررسی مولکولی (RT-PCR): از کیت (QIAamp® Viral RNA Mini، GmBh، آلمان) جهت استخراج RNA استفاده شد. طبق پروتکل، کیت استخراج، برچسب‌گذاری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به‌منظور انجام RT-PCR و جهت توالی‌یابی VP1، واکنش یک‌مرحله‌ای مطابق با استاندارد آزمایشگاه مرجع جهانی تب برفکی با استفاده از پرایمر جلوبر O-1C244F (5'- GCAGCAAAACACATGTCAAACACCTT-3') و پرایمر معکوس NK-61 GACATGTCCTCCTGCATCTG-3')

5'-) و با استفاده از کیت QIAGEN انجام شد. همچنین برای تعیین تیپ از پرایمر جلوبر O-F1 (CCGAGACAGCGTTGGATAACA) و پرایمر معکوس O-R1 (CCATACTTCCAGTTCCCGTTGT) استفاده شد (۴).

خالص‌سازی و تعیین توالی اسید نوکلئیک: به‌منظور خالص‌سازی محصول PCR از کیت (Roche/Germany) و برای انجام تعیین توالی از پرایمر جلوبر O1-C (AATTACACATGGCAAGGCCGACGG) و پرایمر معکوس NK72 (GAAGGCCCCAGGGTTGGACTC) استفاده شد.

تشخیص ویروس و تیپ‌های ویروس تب برفکی با استفاده از Real Time PCR: RNA استخراج‌شده به شیوه‌ای که به آن اشاره شد، برای شناسایی حضور ویروس تب برفکی به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی منطقه 3D ژنوم تب برفکی انجام شد. سپس نمونه‌های مثبت جهت تعیین تیپ به روش Multiplex Real Time PCR آزمایش شدند. پس از اتمام آزمایش نتیجه با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و آنالیز در کانال Fam,Yellow, Red بررسی و نتیجه ثبت گردید.

بررسی میزان شباهت آنتی‌ژنیسیته ویروس در گردش با ویروس واکسن Relationship value (R-value): بدین منظور از آزمایش دوبعدی خنثی‌سازی ویروس (Two Dimensional Virus Neutralisation Test) با استفاده از سرم معلوم سویه واکسن که تیتر آنتی‌بادی همولوگ آن از پیش تعیین شده است، انجام شد. در تیتر درصد TCID50 بر میلی‌لیتر در برابر دُز مشابه از ویروس‌های هترولوگ در گردش در مزرعه استفاده گردید بنابراین سرم و ویروس استاندارد (استفاده‌شده در واکسن) و ویروس جداشده از مزرعه تیتر شدند. جهت تیتراسیون سرم، داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای به‌جز خانه‌های ستون اول مقدار ۵۰ میکرولیتر محیط ایگل کامل حاوی ۲ درصد سرم جنین ریخته و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم خالص به دو خانه ابتدایی ستون اول منتقل و رقت‌های متوالی تا آخرین ستون تهیه گردید. به تمام خانه‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر ویروس همولوگ حاوی درصد TCID50 بر میلی‌لیتر واحد ویروسی اضافه گردید و در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2، به‌مدت ۱ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. به هریک از خانه‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی 10^6 سلول بر میلی‌لیتر سلول BHK21 کلون H9 رازی اضافه، به انکوباتور منتقل و به‌مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت میکروپلیت‌ها توسط میکروسکوپ غیرمستقیم بررسی و نتایج ثبت و درنهایت تمام چاهک‌ها توسط محلول رنگی حاوی متیلن بلو، آمیدو بلاک و اسید سیتریک رنگ‌آمیزی گردید. تیتر سرم براساس آخرین رقتی که ۵۰ درصد خانه‌های آن سالم باقی مانده با روش Reed and Muench محاسبه شد. کنترل سرم، کنترل ویروس، کنترل سلول و کنترل محیط در نظر گرفته و ویروس مورداستفاده هم‌زمان در میکروپلیت جداگانه تیتر شد. برای تیتراسیون از ویروس‌هایی که قبلاً تیتر آن را داشتند (۵/۵-۱۰) رقت‌های یک‌دوم از ۲/۵-۱۰ تا ۴/۵-۱۰ تهیه شد. برای هر رقت ۸ چاهک استفاده و به هریک از چاهک‌ها سلول IBRS-2 افزوده و به‌مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. اگر ویروس به اندازه کافی رشد می‌کرد، سلول‌ها می‌مردند (CPE). برای محاسبه، جمع خانه‌هایی که CPE ۱۰۰درصد داشتند بر تعداد چاهک‌هایی که برای هر رقت استفاده شده (۸ چاهک)، تقسیم و عدد به‌دست‌آمده منهای ۰/۵ و سپس ضربدر ۰/۳ شد و با رقتی که درصد چاهک‌ها CPE ایجاد کرده بود، جمع گردید. جهت محاسبه میزان شباهت آنتی‌ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن(Relationship value (R-value تیتر ویروس به‌دست‌آمده از ویروس در گردش پس از VN در برابر سرم مرجع، منهای تیتر ویروس به‌دست‌آمده از ویروس واکسن پس از VNدر برابر سرم مرجع محاسبه و سپس آنتی‌لوگاریتم گرفته شد.

جدول ۱. سکانس‌های پرایمرهای استفاده‌شده برای شناسایی و تعیین تیپ ویروس تب برفکی توسط Multiplex Real Time PCR.

پرایمر یا تک	تیپ ویروس	سکانس
Primer Forward	Type A F	ACGACCATCCACGAGCTYC
Primer Reverse	Type A R	RCAGAGGCCTGGGACAGTAG
Taq Man probe	Type A Probe	JOE-CGTGCGCATGAAACGTGCCG-BHQ2
Primer Forward	Type O F	ACGCGCAGAGGAATTCGAATCA
Primer Reverse	Type O R	ATCGYAGRTTWTTCGGCTTAT
Taq Man probe	Type O Probe	FAM-5-ATGCYTCCGCCTCGCAGGCT-3-TAMRA
Primer Forward	Type As1 F	ACGCGCAGAGGAATTCGAATCA
Primer Reverse	Type As1 R	ATCGYAGRTTWTTCGGCTTAT
Taq Man probe	Type As Probe	Cy5-5-ATGCYTCCGCCTCGCAGGCT-3-TAMRA

جدول ۲. نام شهرستان، سال و دام جداشده با ویروس تب برفکی در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱.

نام ویروس	شهرستان ، سال و دام جدا شده
O/IRN/KHO/1/2022	گناباد–۱۴۰۰–گاو
O/IRN/KHO/3/2022	مشهد–۱۴۰۰–گوسفند
O/IRN/KHO/4/2022	تربت جام–۱۴۰۱–گاو
O/IRN/KHO/6/2022	مشهد–۱۴۰۱–گاو
O/IRN/KHO/7/2022	جغتای–۱۴۰۱–گاو

جدول ۳. نتایج حاصل از میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس‌های جداشده با سایر ویروس‌های جداشده در سال ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱، ویروس‌های ایران و منطقه که توالی اسید نوکلئیک آن‌ها در بانک ژن موجود می‌باشد با نرم‌افزار MEGA.

Seq->	۱	۲	۳	۴	۵	۶6	۷	۸	۹	۱۰
1-O/IRN/KHO/1/2022	ID	۰/۹۸۵	۰/۹۳۹	۰/۹۷۵	۰/۹۷	۰/۸۸۳	۰/۹۳۴	۰/۹۲۹	۰/۹۶۳	۰/۹۵۱
2-O/IRN/KHO/3/2022	۰/۹۸۵	ID	۰/۹۴۴	۰/۹۷۵	۰/۹۷	۰/۸۸۸	۰/۹۳۹	۰/۹۳۴	۰/۹۶۸	۰/۹۵۱
3-O/IRN/KHO/4/2022	۰/۹۳۹	۰/۹۴۴	ID	۰/۹۲۴	۰/۹۲۲	۰/۸۸۳	۰/۹۳۱	۰/۹۲۹	۰/۹۴۶	۰/۹۳۹
4-O/IRN/KHO/6/2022	۰/۹۷۵	۰/۹۷۵	۰/۹۲۴	ID	۰/۹۸	۰/۸۸۵	۰/۹۲۹	۰/۹۲۴	۰/۹۶۸	۰/۹۶۵
5-O/IRN/KHO/7/2022	۰/۹	۰/۹۷	۰/۹۲۲	۰/۹۸	ID	۰/۸۷۵	۰/۹۲۲	۰/۹۱۷	۰/۹۵۱	۰/۹۴۸
6-MN539142.1 /O/IRN/93/2016	۰/۸۸۳	۰/۸۸۸	۰/۸۸۳	۰/۸۸۵	۰/۸۷۵	ID	۰/۹۲۲	۰/۹۱۷	۰/۹۰۲	۰/۹
7-O/KHO/IRN/L5 /2010/Iran	۰/۹۳۴	۰/۹۳۹	۰/۹۳۱	۰/۹۲۹	۰/۹۲۲	۰/۹۲۲	ID	۰/۹۸۵	۰/۹۵۶	۰/۹۴۸
8-JF916986.1/ KHO/IRN/Iran	۰/۹۲۹	۰/۹۳۴	۰/۹۲۹	۰/۹۲۴	۰/۹۱۷	۰/۹۱۷	۰/۹۸۵	ID	۰/۹۵۱	۰/۹۴۴
10-/Pak/ O/LHR-12/19/Pakistan	۰/۹۶۳	۰/۹۶۸	۰/۹۴۶	۰/۹۶۸	۰/۹۵۱	۰/۹۰۲	۰/۹۵۶	۰/۹۵۱	ID	۰/۹۸۲
11-/AFG/23/2017 /VP1/Afghanistan	۰/۹۵۱	۰/۹۵۱	۰/۹۳۹	۰/۹۶۵	۰/۹۴۸	۰/۹	۰/۹۴۸	۰/۹۴۴	۰/۹۸۲	ID

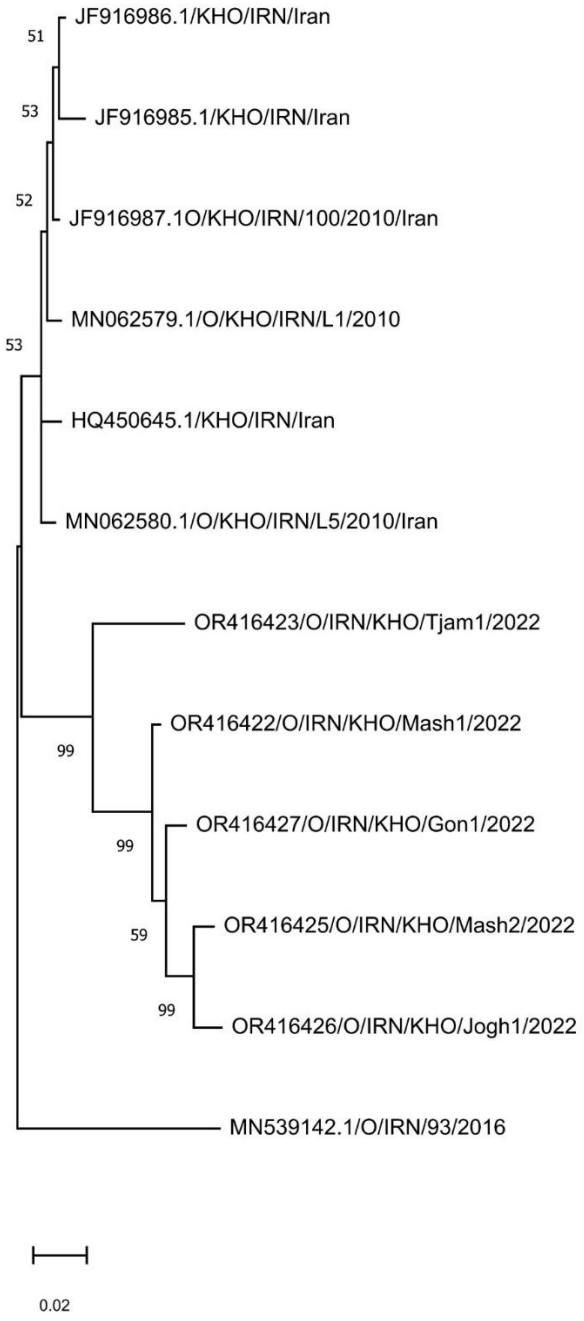
روش‌های تجزیه‌وتحلیل داده‌ها و نرم‌افزارهای مورداستفاده: در این بررسی ملاک قضاوت درمورد آلوده بودن نمونه‌ها از کانون‌های مشکوک، نتایج آزمایشات ELISA یا Real -Time PCR می‌باشد. توزیع نتایج به‌دست‌آمده براساس نام شهرستان و ماه جداسازی به‌صورت فراوانی نسبی تهیه شد. همچنین از سیستم Blast در پایگاه NCBI برای جست‌وجوی اسیدهای نوکلئیک مشابه با توالی‌های نوکلوتیدی به‌دست‌آمده و در برخی موارد برای تعیین درصد تشابه استفاده شد. برای مقایسه اسیدهای نوکلئیک ویروس‌های تعیین توالی‌شده و تعیین درصد تشابه نوکلوتیدها، همچنین رسم دندروگرام‌ها از نرم‌افزارهای BioEdit و MEGA-X استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از الایزا وReal Time: در سال ۱۴۰۰ از تعداد ۴۰ نمونه موردآزمایش، ۱۴ نمونه برای گاو و ۴ نمونه برای گوسفند مثبت بود و در سال ۱۴۰۱ از تعداد ۱۴ نمونه موردآزمایش، ۵ نمونه متعلق به گاو و ۱ نمونه متعلق به گوسفند مثبت بود که همه نمونه‌های موردآزمایش سال ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ تیپ O تشخیص داده شدند.

نتایج حاصل از آزمایش کشت سلولی: از ۹ ویروس جداشده در کشت سلولی در سال ۱۴۰۰، تعداد ۷ نمونه گاوی و ۲ نمونه گوسفندی بود؛ از ۷ ویروس جداشده در سال ۱۴۰۱، تعداد ۵ نمونه گاوی و ۲ نمونه گوسفندی بود که تمام نمونه‌ها با الایزا و Real Time PCR تیپ O تشخیص داده شدند.

نتایج حاصل از بررسی مناطق مشکوک و آلوده به بیماری تب برفکی در فصل‌های سال: نتایج نشان داد در بهار، تابستان، پاییز و زمستان ۱۴۰۰ به‌ترتیب ۴۴/۴۴، ۵/۵۶، ۳۳/۳۳، ۱۶/۶۷ درصد و در سال ۱۴۰۱ به‌ترتیب ۱۶/۶۷، ۰، ۵۰ و ۳۳/۳۳ درصد می‌باشند.



نمودار ۱. رسم نمودار فیلوژنتیک ویروس‌های تب برفکی تیپ O جداشده از استان در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ و مقایسه آن‌ها با ویروس‌های تب برفکی تیپ O در ایران و منطقه ثبت‌شده در NCBI با نرم‌افزار MEGA.

نتایج حاصل از تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک ۵ ویروس تب برفکی تیپ O تعیین توالی‌شده: نتایج با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) نشان داد ویروس O/IRN/KHO/1/2022 (جدول۲) بیشترین تشابه (۹۸/۵ درصد) را با ویروس O/IRN/KHO/3/2022 و ویروس O/IRN/KHO/7/2022 کمترین تشابه (۹۰/۷ درصد) را با ویروس O/IRN/KHO/4/2022 دارد (جدول ۳، نمودار ۱).

نتایج حاصل از بررسی قرابت آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های جداشده در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ با ویروس مرجع واکسینال (ویروس به‌کاررفته در واکسن): نتایج نشان داد در هر ۵ موردمحاسبه ضریب شباهت آنتی‌ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن (R-value) بزرگتر از ۰/۳ می‌باشد.

بحث

بیماری تب برفکی بسیار واگیردار است، بنابراین به‌منظور سیاست‌گذاری برای مبارزه با بیماری، تشخیص سریع آن بسیار ضروری می‌باشد. یکی از راه‌های مهم کنترل بیماری استفاده از واکسن می‌باشد. اثربخشی واکسن‌های مورداستفاده می‌تواند اطلاعات باارزشی برای برنامه‌ریزی جهت کنترل بیماری فراهم کند (۸). در مطالعه حاضر ۳۴/۵۲ درصد از نمونه‌های مشکوک مثبت تشخیص داده شدند. از این تعداد ۳۳/۳۳ درصد متعلق به گوسفند و ۶۶/۶۷ درصد متعلق به گاو می‌باشد. تمام سروتیپ‌های تشخیص داده‌شده تیپ O می‌باشند. طبق گزارش آزمایشگاه مرجع جهانی (WRL) در سال ۲۰۲۳ تمام ویروس‌های تب برفکی سال ۲۰۲۲ در ایران تیپ O می‌باشند (۹). هم‌اکنون آزمایش الایزا یکی از مهم‌ترین و معتبرترین آزمایش‌های تشخیصی برای ویروس تب برفکی است. Real Time PCR و RT-PCR آزمایش‌هایی می‌باشند که توانایی شناسایی مقادیر اندک ژنوم ویروسی موجود در نمونه را دارند و می‌توانند به‌عنوان جایگزین سریع و ساده برای آزمایش کشت سلولی مطرح شوند. آنتی‌ژن و RNA شناسایی‌شده در الایزا و RT-PCR الزاماً بیانگر وجود ویروس عفونی نیست و ممکن است ویروس‌های گرفته‌شده با آزمایش الایزا مثبت تشخیص داده شوند، اما در کشت سلولی رشد نکنند (۴، ۷).

مطالعه Zibaee و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد آزمایش RT-PCR آزمایش معتبری برای تشخیص ویروس تب برفکی است (۱۰). نتایج میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس‌های جداشده با ویروس به‌کاررفته در واکسن MN539142.1 /O/IRN/93/2016 بیشتر از ۸۷/۵ درصد می‌باشد. بنابراین احتمال اینکه تفاوت سویه در گردش در مزرعه چنان باشد که واکسن با سویه به‌کاررفته نتواند ایمنی لازم را ایجاد کند بسیار کم و نزدیک به صفر است (نتیجه R-Value به‌دست‌آمده تأیید می‌کند). نتایج حاصل از بررسی قرابت آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های جداشده از استان در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ با ویروس مرجع واکسینال (ویروس به‌کاررفته در واکسن مؤسسه رازی) نیز این مورد را تأیید کرد. به‌طور کلاسیک ویروس تب برفکی تیپ O به ۱۱ تیپ آنتی‌ژنیک تقسیم می‌شود (۱۱). باتوجه‌به جایگزینی تیپ O سویه Pan-Asia در خاورمیانه می‌توان حدس زد این ویروس‌ها از سویه پان آسیا و عضوی از توپوتیپ خاورمیانه ـ جنوب‌شرقی آسیا (Middle East - Southeast Asia topotype) باشند. هم‌اکنون مشخص شده است دگرگونی آنتی‌ژنیک در سروتیپ O از آنچه تصور می‌شده وسیع‌تر نیست و چند سویه واکسن به‌طور نسبی قادر به محافظت علیه بیشتر همه‌گیری‌ها می‌باشند. مگرآنکه اختلاف ژنتیکی آن‌قدر زیاد باشد که اجازه دسته‌بندی در چندین دودمان جداگانه را بدهد (۱۲). ویروس‌های دارای RNA به‌دلیل اینکه قدرت بهره‌جویی از مکانیسم اصلاح اشتباه در حین نسخه‌برداری و تکثیر ژنومی را ندارند، میزان موتاسیون (۱ درصد در سال) در آن‌ها زیاد است. این میزان تغییرات بسیار زیادتر از آن است که در عمل در جامعه دامی در ویروس در حال گردش اتفاق می‌افتد و این شاید به دلایل برآورد زیاد میزان موتاسیون، موتاسیون‌های بی‌اثر و قدرت عفونت‌زایی تعداد کم ویروس‌های جهش‌یافته باشد و اینکه بسیاری از موتاسیون‌ها در جایگاه تأثیرگذار آنتی‌ژنتیکی نمی‌باشند (۱۳).

اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی بیان می‌کند طی سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹، ۵۰ درصد از نمونه‌هایی که در گاو آلوده تشخیص داده شده‌اند، تیپ O ویروس تب برفکی بودند و این میزان در گوسفند، ۷۲/۱ درصد نمونه‌های تأییدشده می‌باشد. نتایج به‌دست‌آمده با نتایج Zibaee و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد (۴). نتایج بررسی قرابت آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های جداشده نشان داد در هر ۵ مورد، ضریب شباهت آنتی‌ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن (R-value) بزرگتر از ۰/۳ می‌باشد. این امر حاکی از آن است که واکسن ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی قدرت محافظت‌کنندگی در برابر ویروس همولوگ را دارد. طبق گزارش اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی، دامدارها علاوه‌بر واکسن پلی‌والان رازی از واکسن‌های ساخت کشورهای خارجی (واکسن تب‌های برفکی رکشا واک هند، آفتو واک ترکیه، مریال و وتاک) استفاده می‌کنند. پیشنهاد می‌شود با برگزاری جلسات ترویجی مناسب به دامداران توصیه شود به دلایل ذکرشده از واکسن ساخت کشور استفاده کنند و هر ۲ تا ۳ سال بررسی قرابت آنتی‌ژنیسیتی ویروس‌های در گردش با ویروس‌های واکسینال انجام شود. درمورد کانون‌های درگیر چنین به نظر می‌رسد که طبق گزارش اداره کل دامپزشکی استان، تعداد کانون‌های مشکوک (براساس علائم بالینی و ارسال نمونه) از تعداد متناسبی برخوردار می‌باشند و آنچه از بروز بیماری طی ۱ سال رخ داده طبق موارد قابل‌انتظار بوده است. این امر تأییدکننده نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌باشد که بنابر بررسی ژنتیکی و آنتی‌ژنتیکی واکسن مصرفی ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی قدرت محافظتی مناسبی را نشان داده است.

نکته قابل‌ذکر این است که OIE بر انجام واکسیناسیون جمعیت گاوی تأکید می‌کند و معتقد است با کنترل بیماری در گاو، بیماری در جمعیت گوسفندی خودبه‌خود کنترل می‌شود، اما علی‌رغم این توصیه باید توجه کرد که در کشور ما جمعیت نشخوارکنندگان کوچک حدوداً ۱۰ برابر جمعیت گاوی است و به‌علت فرهنگ دامداری در منطقه و وجود دام‌های عشایری، می‌بایست برای جمعیت گوسفندی و واکسیناسیون آن اهمیتی ویژه قائل شد. باید توجه کرد که گوسفند و بز می‌توانند در اپیدمیولوژی تب برفکی نقش خطرناکی داشته باشند، چراکه نشانه بیماری در این حیوانات معمولاً فاقد علائم بالینی واضح است و یا با علائم بسیار خفیف همراه می‌باشند (۱، ۴). اگرچه اولویت برنامه کنترلی بر روی مایه‌کوبی سراسری در جمعیت گاو و گوساله متمرکز می‌باشد، به نظر می‌رسد به‌دلیل نقش گوسفند در اپیدمیولوژی بیماری اسکان عشایر و یا پوشش واکسیناسیون کامل جمعیت دامی آن‌ها بتواند گامی مؤثر در کنترل بیماری تب برفکی باشد. گسترش ویروس تب برفکی در روسیه، قزاقستان و مغولستان که عاری از ویروس گزارش شده بودند در سال‌های ۲۰۲۱ و ۲۰۲۲ نتایج نشان داد این جدایه‌ها متعلق به زیرشاخه O/ME-SA/Ind-2001 می‌باشند. بنابراین باتوجه‌به حرکت فرامرزی و جهانی ویروس O، به‌منظور توسعه استراتژی‌های به‌موقع و آماده‌سازی واکسن جهت مطابقت با تنوع ژنتیکی، یک برنامه مناسب برای نظارت بر بیماری تب برفکی در کشورهای دارای دامداری پیشرفته نیاز است (۱۴).

نتیجه‌گیری نهایی: درمورد کانون‌های درگیر در استان چنین به نظر می‌رسد که طبق گزارش اداره کل دامپزشکی تعداد کانون‌های مشکوک (براساس علائم بالینی و ارسال نمونه) از تعداد متناسبی برخوردار می‌باشد و آنچه از بروز بیماری طی ۱ سال رخ داده، قابل‌انتظار بوده است. این امر تأییدکننده نتایج حاصل از مطالعه حاضر است که واکسن مصرفی ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی قدرت محافظتی مناسبی در استان نشان داده است.

سپاسگزاری

از اعضای محترم کمیته علمی مؤسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی جهت تصویب طرح مشترک با اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی و آقای سیادتی‌فر تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Hughes GJ, Mioulet V, Haydon DT, Kitching RP, Donaldson AI, Woolhouse ME. Serial passage of foot-and-mouth disease virus in sheep reveals declining levels of viraemia over time. J General Virol. 2002;83(8):1907-14. doi: 10.1099/0022-1317-83-8-1907

2. Aslam M, Alkheraije KA. The prevalence of foot-and-mouth disease in Asia. Front Vet Sci. 2023;30(10):1201578. doi: 10.3389/fvets.2023.1201578

3. Knowles. FAO World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease. England, Perbright. WRLFMD; 2022; Pirbright.England.

4. Zibaei S, Keivanfar H, Rabbani M, Hematzadeh F, Kianizade M, Fathinajafi M, et al. Comparative study on 1D (VP1) region of foot and mouth disease virus (type A strain) among different isolates: Khorasan Razavi isolates and other Iranian and neighbouring countries isolate. J Vet Res. 2010;65(3):119-202.

5. Zibaei M, Kianizadeh M, Kevanfar H, Rabani M, Hematzadeh F, Bokaei S. Identification of the foot and mouth disease foci from susceptible foci in Khorasan Razavi province. J Vet Res. 2007;62(3):151-155.

6. Asfor AS, Howe N, Grazioli S, Berryman S, Parekh K, Wilsden G, et al. Detection of bovine antibodies against a conserved capsid epitope as the basis of a novel universal serological test for foot-and-mouth disease. J Clin Microbiol. 2020;26;58(6):10-128. doi: 10.1128/JCM.01527

7. Mahravani H, Keyvanfar H, Hemmatzadeh F, Bokaie S, Izadi H, Taghizadeh M, Sotudeh M. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus in ruminant during 2005-2006. J Vet Res. 2010;65(2):123-128.

8. Zhang X, Ma W, Yang F, Yang Y, Lv L, Wu J, Liu B, et al. Epidemiological and Genetic Analysis of Foot-and-Mouth Disease Virus O/ME-SA/Ind-2001 in China between 2017 and 2021. Transbound Emerg Dis. 2023;1-10. doi: 10.1155/2023-3761703

9. Knowles. FAO World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease. England, Perbright.WRLMEG.2023; Pirbright.England.

10. Zibaee S, Rezaee S, Rashtibaf M. Evaluate the frequency of foot and mouth disease viral carriers in slaughtered sheep in Mashhad industrial abattoir using RT-PCR. J Vet Res. 2015;70(1):7-14. doi: 10.22059/jvr.2015.52963

11. Kitching RP. Clinical variation in foot and mouth disease: cattle. Rev Sci Tech. 2002;21(3):499-502. doi: 10.20506/rst.21.3.1343

12. Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. Virus Res. 2003;91(1):65-80. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00260-5

13. Rahman AA, Islam SS, Sufian MA, Talukder MH, Ward MP, Martínez-López B. Foot-and-Mouth disease space-time clusters and risk factors in cattle and buffalo in Bangladesh. Pathogens. 2020;9(6):423. doi: 10.3390/pathogens9060423

14. Nikiforov V, Shcherbakov A, Chvala I, Kremenchugskaya S, Korennoy F, Mayorova T, et al. Insights into the Molecular Epidemiology of Foot-and-Mouth Disease Virus in Russia, Kazakhstan, and Mongolia in Terms of O/ME-SA/Ind-2001e Sublineage Expansion. Viruses. 2023;15(3):598. doi: 10.3390/v15030598