



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

Saeid Zibae^{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

doi: [10.22059/JVR.2024.374527.3428](https://doi.org/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 2022 in 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 © The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

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



How to cite this article:

Zibae 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. Journal of Veterinary Research, 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.



بررسی قرابت و تغییرات آنتی ژنتیکی ویروس تب برفکی با ویروس های واکسینال در استان خراسان رضوی در سال های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱

سعید زیبایی^۱، اکبر خراسانی^۲، ناصر مرگان ازغدی^۳، مریم ترابی^۳، حمیدرضا فرزین^۱

^۱ بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
^۲ بخش تولید واکسن تب برفکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم 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

doi: 10.22059/jvr.2024.374527.3428

چکیده

زمینه مطالعه: تب برفکی یکی از مهم ترین بیماری های ویروسی دام است. تب های A، O و Asia1 ویروس تب برفکی از دیرباز در ایران بومی می باشند. **هدف:** در مطالعه حاضر اپیدمیولوژی مولکولی، قرابت و تغییرات آنتی ژنتیکی ویروس تب برفکی با ویروس های واکسینال در استان خراسان رضوی در سال های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ بررسی شد.

روش کار: ۵۱ نمونه گرفته شده از دام های مشکوک دارای علائم بالینی در سال های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱، توسط آزمایش های الایزا، Real Time RT-PCR، RT-PCR و کشت سلولی بررسی شد و قرابت آنتی ژنسیستی ۵ ویروس در گردش با ویروس واکسن (R-value) ساخته شده در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی محاسبه گردید.

نتایج: ۳۴/۵۲ درصد از نمونه های مشکوک مثبت بود که از این تعداد ۳۳/۳۳ و ۳۵/۷۲ درصد به ترتیب متعلق به گوسفند و گاو بود. تمام نمونه ها 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 نوکلئوتیدی شده ویروس ها 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 ویروس های جدا شده با ویروس به کاررفته در واکسن MN539142.1 / O/IRN/93/2016 بیشتر از ۸۷/۵ درصد بود و در هر ۵ مورد محاسبه ضریب شباهت آنتی ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن بزرگتر از ۰/۳ بود.

نتیجه گیری نهایی: واکسن ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدرت تولید آنتی بادی محافظتی و ایجاد ایمنی لازم در برابر ویروس های عامل بیماری تب برفکی در حال گردش در استان خراسان رضوی را طی سال های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ داشته است.

کلمات کلیدی: آنتی ژنتیکی، آنتی ژنسیستی، بیماری تب برفکی، ویروس تب برفکی، ویروس واکسینال

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: سعید زیبایی، بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، مشهد، ایران

مقدمه

تب برفکی دشمن سرمایه دامی و یکی از مهم ترین بیماری های ویروسی دام می باشد (۱). این بیماری به شدت 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 می شود و ۵ درصد تلفات در دام های جوان ایجاد می کند. ویروس تب برفکی از خانواده پیکورناویریده و از جنس آفتوویروس است که ۷ تیپ A، O، C، Asia1، SAT1، SAT2، SAT3 و بیش از ۸۵ تحت تیپ دارد. تیپ های A و O در آفریقا، آسیا و بخشی از آمریکای جنوبی در گردش می باشند، در حالی که تیپ C ظاهراً

ناپدید شده است (۱). تیپ SAT2 در عراق در سال ۲۰۲۲ به طور محدود و همچنین تیپ Asia1 در سال ۲۰۲۱ در پاکستان گزارش شده است (۲، ۳). از دیرباز در ایران تیپ های A، O، و Asia1 و ویروس تب برفکی بومی می باشند. ناحیه ژنومی 1D ژن ویروس مسئول صدور رمز برای تولید مهم ترین پروتئین آنتی ژن سطحی (VP1) است. با مطالعه فعالیت مناطقی از VP1 و نیز تعیین توالی این منطقه در سروتیپ های مختلف FMDV معلوم شد بیشترین تغییرات آنتی ژنتیکی مربوط به مناطقی از ژنوم ویروس است که اسید آمینه های ۱۴۱ تا ۱۶۰ و ۲۰۰ تا ۲۱۳ کد می دهد (۴). تنوع بالای ویروس باعث می شود کنترل این بیماری از طریق واکسیناسیون سخت باشد. وجود دام های ناقل هم سبب باقی ماندن ویروس در گله می شود و کنترل بیماری را دشوار می کند. تشخیص اولیه ویروس در نمونه های مشکوک توسط آزمایش الایزا انجام می شود. همچنین از RT-PCR و Real time PCR برای تشخیص و تعیین تیپ های ویروس تب برفکی در آزمایشگاه مرجع جهانی (World Reference Laboratory for FMD, pirbright) استفاده می گردد.

باید در نظر داشت در کشورهای همسایه، کشورهایی وجود دارند که نه تنها بیماری در آن ها بومی است، بلکه بعضاً مبارزه با این بیماری در این کشورها، نظیر افغانستان، با علامت سؤال مواجه است. ترس از بیماری نه تنها برای کشورهای اندمیک آزاردهنده می باشد، بلکه تهدید احتمال سرایت آن به کشورهای پاک نیز حاشیه امنیت آن ها را با خطر مواجه کرده است. چنانچه نگاهی به پدیده بیوتروریسم اقتصادی داشته باشیم، وسعت میدان مبارزه بسیار وسیع تر می شود. 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 می باشد. 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. در صورتی که 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 سویه های در گردش سبب پیش بینی وقوع احتمالی همه گیری های شدید خواهد شد و یا ممکن است موجب تصمیم گیری برای تغییر سویه های واکسینال گردد. مطالعه حاضر سویه های در گردش مزارع را طی سال های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ پایش ژنومی کرده و قرابت ژنتیکی ویروس های جدا شده را با ویروس های ثبت شده در بانک ژنی و ویروس های موجود در واکسن تب برفکی تولید شده در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بررسی کرده است.

مواد و روش کار

نمونه گیری و آماده سازی نمونه: ۵۱ نمونه از ضایعات لثه و زبان دام های مشکوک توسط دامپزشکان اخذ و داخل بافر فسفات حاوی ۵۰ درصد گلیسرول به آزمایشگاه ارسال شد. جهت آماده سازی، نمونه پس از له و ساییده شدن کامل در هاون چینی و هموژن کردن زیر هود کلاس II با شرایط ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد 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 آماده سازی نمونه ها طبق دستورالعمل کیت (کیت الایزای تشخیص آنتی ژن تب برفکی IZSLER Brescia، ایتالیا) آزمایش ساندویچ الایزای غیرمستقیم انجام شد. متوسط OD هر نمونه پس از کسر OD (Blank) در صورتی که 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. مدت زمان انکوباسیون برای کنترل و دیدن CPE برای هر پاساژ ۴۸ ساعت بود. نمونه های منفی تا ۳ پاساژ کشت داده شدند (۷).

بررسی مولکولی (RT-PCR): از کیت (GmBh، QIAamp® Viral RNA Mini، آلمان) جهت استخراج RNA استفاده شد. طبق پروتکل، کیت استخراج، برچسب گذاری و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. به منظور انجام RT-PCR و جهت توالی یابی VP1، واکنش یک مرحله ای مطابق با استاندارد آزمایشگاه مرجع جهانی تب برفکی با استفاده از پرایمر جلوبر O-1C244F (5'- GCAGCAAAACACATGTCAAACACCTT-3') و پرایمر معکوس (3'- GACATGTCCTCCTGCATCTG-5') انجام شد.

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).

خالص سازی و تعیین توالی اسید نوکلئیک: به منظور خالص سازی 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 تیپ های ویروس تب برفکی با استفاده از Real Time PCR: RNA استخراج شده به شیوه ای 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 نمونه های مثبت جهت تعیین تیپ به روش Multiplex Real Time PCR آزمایش شدند. پس از اتمام آزمایش نتیجه با استفاده از نرم افزار دستگاه و آنالیز در کانال Fam, Yellow, Red بررسی و نتیجه ثبت گردید.

بررسی میزان شباهت آنتی ژنیسیته ویروس در گردش با ویروس واکسن (Relationship value (R-value): بدین منظور از آزمایش دوبعدی خنثی سازی ویروس (Two Dimensional Virus Neutralisation Test) با استفاده از سرم معلوم سویه واکسن که تیتراژ آنتی بادی همولوگ آن از پیش تعیین شده است، انجام شد. در تیتراژ درصد TCID₅₀ بر میلی لیتر در برابر دُز مشابه از ویروس های هترولوگ در گردش در مزرعه استفاده گردید بنابراین سرم و ویروس استاندارد (استفاده شده در واکسن) و ویروس جدا شده از مزرعه تیتراژ شدند. جهت تیتراسیون سرم، داخل چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای به جز خانه های 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 رقت های متوالی تا آخرین ستون تهیه گردید. به تمام خانه ها مقدار ۵۰ میکرولیتر ویروس همولوگ حاوی درصد TCID₅₀ بر میلی لیتر واحد ویروسی اضافه گردید و در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂، به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. به هریک از خانه ها مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۰^۶ سلول بر میلی لیتر سلول BHK21 کلون H9 رازی اضافه، به انکوباتور منتقل و به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت میکروپلیت ها توسط میکروسکوپ غیرمستقیم بررسی و نتایج ثبت و در نهایت تمام چاهک ها توسط محلول رنگی حاوی متیلن بلو، آمیدو بلاک و اسید سیتریک رنگ آمیزی گردید. تیتراژ سرم براساس آخرین رقتی که ۵۰ درصد خانه های 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 مورد استفاده هم زمان در میکروپلیت جداگانه تیتراژ شد. برای تیتراسیون از ویروس هایی که قبلاً تیتراژ آن را داشتند (۱۰-۵/۵) رقت های یک دوم از ۱۰-۲/۵ تا ۱۰-۴/۵ تهیه شد. برای هر رقت ۸ چاهک استفاده و به هریک از چاهک ها سلول IBRS-2 افزوده و به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری گردید. اگر ویروس به اندازه کافی رشد می کرد، سلول ها می مردند (CPE). برای محاسبه، جمع خانه هایی که CPE ۱۰۰ درصد داشتند بر تعداد چاهک هایی که برای هر رقت استفاده شده (۸ چاهک)، تقسیم و عدد به دست آمده منهای ۰/۵ و سپس ضربدر ۰/۳ شد و با رقتی که درصد چاهک ها CPE ایجاد کرده بود، جمع گردید. جهت محاسبه میزان شباهت آنتی ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن (Relationship value (R-value) تیتراژ ویروس به دست آمده از ویروس در گردش پس از VN در برابر سرم مرجع، منهای تیتراژ ویروس به دست آمده از ویروس واکسن پس از VN در برابر سرم مرجع محاسبه و سپس آنتی لوگاریتم گرفته شد.

جدول ۱. سکانس های پرایمرهای استفاده شده 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-ATGCTTCCGCTCGCAGGCT-3-TAMRA
Primer Forward	Type As1 F	ACGCGCAGAGGAATTCGAATCA
Primer Reverse	Type As1 R	ATCGYAGRTTWTTCGGCTTAT
Taq Man probe	Type As Probe	Cy5-5-ATGCTTCCGCTCGCAGGCT-3-TAMRA

جدول ۲. نام شهرستان، سال و دام جدا شده با ویروس تب برفکی در سال های 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 ویروس های جدا شده با سایر ویروس های جدا شده در سال ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱، ویروس های ایران و منطقه که توالی اسید نوکلئیک آن ها در بانک ژن موجود می باشد با نرم افزار MEGA.

Seq->	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
1-O/IRN/KHO/1/2022	ID	0/985	0/939	0/975	0/97	0/883	0/934	0/929	0/963	0/951
2-O/IRN/KHO/3/2022	ID	0/985	0/944	0/975	0/97	0/888	0/939	0/934	0/968	0/951
3-O/IRN/KHO/4/2022	0/939	0/944	ID	0/924	0/922	0/883	0/931	0/929	0/946	0/939
4-O/IRN/KHO/6/2022	0/975	0/975	0/924	ID	0/98	0/885	0/929	0/924	0/968	0/965
5-O/IRN/KHO/7/2022	0/9	0/97	0/922	0/98	ID	0/875	0/922	0/917	0/951	0/948
6-MN539142.1/O/IRN/93/2016	0/883	0/888	0/883	0/885	0/875	ID	0/922	0/917	0/902	0/9
7-O/KHO/IRN/L5/2010/Iran	0/934	0/939	0/931	0/929	0/922	0/922	ID	0/985	0/956	0/948
8-JF916986.1/KHO/IRN/Iran	0/929	0/934	0/929	0/924	0/917	0/917	0/985	ID	0/951	0/944
10-Pak/O/LHR-12/19/Pakistan	0/963	0/968	0/946	0/968	0/951	0/902	0/956	0/951	ID	0/982
11-AFG/23/2017/VP1/Afghanistan	0/951	0/951	0/939	0/965	0/948	0/9	0/948	0/944	0/982	ID

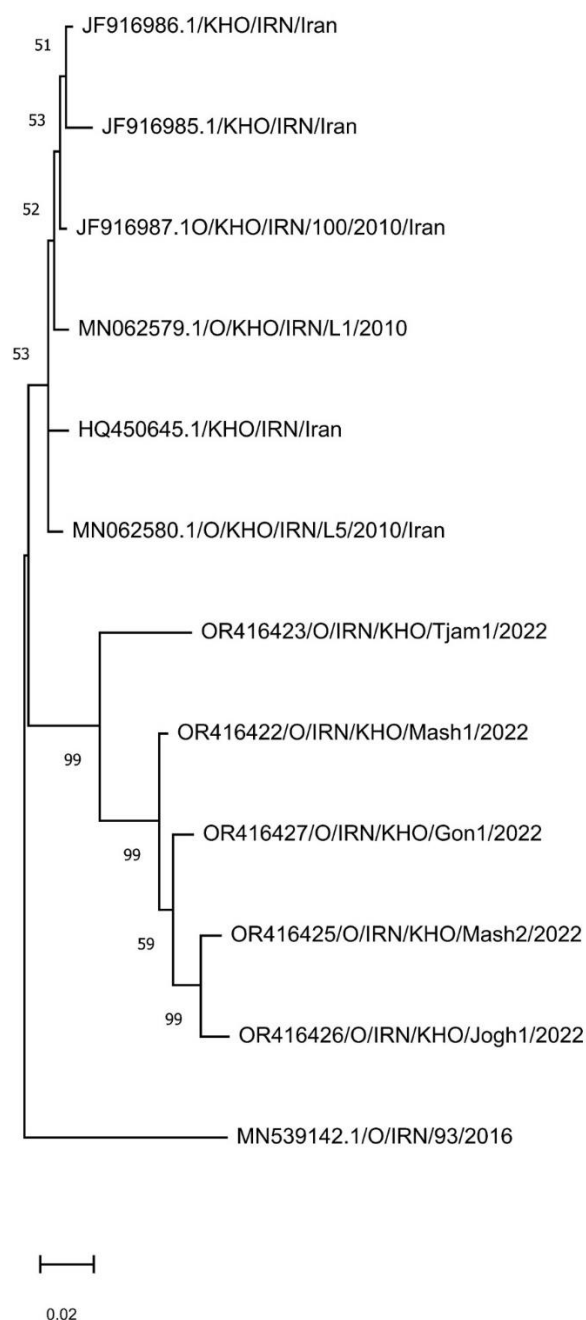
روش های تجزیه و تحلیل داده ها و نرم افزارهای مورد استفاده: در این بررسی ملاک قضاوت درمورد آلوده بودن نمونه ها از کانون های مشکوک، نتایج آزمایشات ELISA یا Real-Time PCR می باشد. توزیع نتایج به دست آمده براساس نام شهرستان و ماه جداسازی به صورت فراوانی نسبی تهیه شد. همچنین از سیستم Blast در پایگاه NCBI برای جست و جوی اسیدهای نوکلئیک مشابه با توالی های نوکلئیدی به دست آمده و در برخی موارد برای تعیین درصد تشابه استفاده شد. برای مقایسه اسیدهای نوکلئیک ویروس های تعیین توالی شده و تعیین درصد تشابه نوکلئیدها، همچنین رسم دندروگرام ها از نرم افزارهای BioEdit و MEGA-X استفاده گردید.

نتایج

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

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

نتایج حاصل از بررسی مناطق مشکوک و آلوده به بیماری تب برفکی در فصل های سال: نتایج نشان داد در بهار، تابستان، پاییز و زمستان ۱۴۰۰ به ترتیب ۴۴/۴۴، ۵۶/۵۶، ۳۳/۳۳، ۱۶/۶۷ درصد و در سال ۱۴۰۱ به ترتیب ۶۷/۶۷، ۱۶/۶۷، ۵۰، ۳۳/۳۳ درصد می باشند.



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

نتایج حاصل از تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک ۵ ویروس تب برفکی تیپ O تعیین توالی شده: نتایج با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) نشان داد ویروس O/IRN/KHO/1/2022 (جدول ۲) 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 آنتی ژنیسیته ویروس‌های جدا شده در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ با ویروس مرجع واکسینال (ویروس به کاررفته در واکسن): نتایج نشان داد در هر ۵ مورد محاسبه ضریب شباهت آنتی ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن (R-value) بزرگتر از ۰/۳ می‌باشد.

بحث

بیماری تب برفکی بسیار واگیردار است، بنابراین به منظور سیاست گذاری برای مبارزه با بیماری، تشخیص سریع آن بسیار ضروری می باشد. یکی از راه های مهم کنترل بیماری استفاده از واکسن می باشد. اثربخشی واکسن های مورد استفاده می تواند اطلاعات بالارزشی برای برنامه ریزی جهت کنترل بیماری فراهم کند (۸). در مطالعه حاضر ۳۴/۵۲ درصد از نمونه های مشکوک مثبت تشخیص داده شدند. از این تعداد ۳۳/۳۳ درصد متعلق به گوسفند و ۶۶/۶۷ درصد متعلق به گاو می باشد. تمام سروتیپ های تشخیص داده شده تیپ O می باشند. طبق گزارش آزمایشگاه مرجع جهانی (WRL) در سال ۲۰۲۳ تمام ویروس های تب برفکی سال ۲۰۲۲ در ایران تیپ O می باشند (۹). هم اکنون آزمایش الایزا یکی از مهم ترین و معتبرترین آزمایش های تشخیصی برای ویروس تب برفکی است. Real Time PCR و RT-PCR آزمایش هایی می باشند که توانایی شناسایی مقادیر اندک ژنوم ویروسی موجود در نمونه را دارند و می توانند به عنوان جایگزین سریع و ساده برای آزمایش کشت سلولی مطرح شوند. آنتی ژن و RNA شناسایی شده در الایزا و RT-PCR الزاماً بیانگر وجود ویروس عفونی نیست و ممکن است ویروس های گرفته شده با آزمایش الایزا مثبت تشخیص داده شوند، اما در کشت سلولی رشد نکنند (۴، ۷).

مطالعه Zibae و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد آزمایش RT-PCR آزمایش معتبری برای تشخیص ویروس تب برفکی است (۱۰). نتایج میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس های جدا شده با ویروس به کاررفته در واکسن MN539142.1 /O/IRN/93/2016 بیشتر از ۸۷/۵ درصد می باشد. بنابراین احتمال اینکه تفاوت سویه در گردش در مزرعه چنان باشد که واکسن با سویه به کاررفته نتواند ایمنی لازم را ایجاد کند بسیار کم و نزدیک به صفر است (نتیجه R-Value به دست آمده تأیید می کند). نتایج حاصل از بررسی قرابت آنتی ژنیسته ویروس های جدا شده از استان در سال های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ با ویروس مرجع واکسینال (ویروس به کاررفته در واکسن مؤسسه رازی) نیز این مورد را تأیید کرد. به طور کلاسیک ویروس تب برفکی تیپ O به ۱۱ تیپ آنتی ژنیک تقسیم می شود (۱۱). با توجه به جایگزینی تیپ O سویه Pan-Asia در خاورمیانه می توان حدس زد این ویروس ها از سویه پان آسیا و عضوی از توپوتیپ خاورمیانه - جنوب شرقی آسیا (Middle East - Southeast Asia topotype) باشند. هم اکنون مشخص شده است دگرگونی آنتی ژنیک در سروتیپ O از آنچه تصور می شده وسیع تر نیست و چند سویه واکسن به طور نسبی قادر به محافظت علیه بیشتر همه گیری ها می باشند. مگر آنکه اختلاف ژنتیکی آن قدر زیاد باشد که اجازه دسته بندی در چندین دودمان جداگانه را بدهد (۱۲). ویروس های دارای RNA به دلیل اینکه قدرت بهره جویی از مکانیسم اصلاح اشتباه در حین نسخه برداری و تکثیر ژنومی را ندارند، میزان موتاسیون (۱ درصد در سال) در آن ها زیاد است. این میزان تغییرات بسیار زیادتر از آن است که در عمل در جامعه دامی در ویروس در حال گردش اتفاق می افتد و این شاید به دلایل برآورد زیاد میزان موتاسیون، موتاسیون های بی اثر و قدرت عفونت زایی تعداد کم ویروس های جهش یافته باشد و اینکه بسیاری از موتاسیون ها در جایگاه تأثیرگذار آنتی ژنتیکی نمی باشند (۱۳).

اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی بیان می کند طی سال های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹، ۵۰ درصد از نمونه هایی که در گاو آلوده تشخیص داده شده اند، تیپ O ویروس تب برفکی بودند و این میزان در گوسفند، ۷۲/۱ درصد نمونه های تأیید شده می باشد. نتایج به دست آمده با نتایج Zibae و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد (۴). نتایج بررسی قرابت آنتی ژنیسته ویروس های جدا شده نشان داد در هر ۵ مورد، ضریب شباهت آنتی ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن (R-value) بزرگتر از ۰/۳ می باشد. این امر حاکی از آن است که واکسن ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدرت محافظت کنندگی در برابر ویروس همولوگ را دارد. طبق گزارش اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی، دامدارها علاوه بر واکسن پلی والان رازی از واکسن های ساخت کشورهای خارجی (واکسن تب های برفکی رکشا واک هند، آفتو واک ترکیه، مریال و واک) استفاده می کنند. پیشنهاد می شود با برگزاری جلسات ترویجی مناسب به دامداران توصیه شود به دلایل ذکر شده از واکسن ساخت کشور استفاده کنند و هر ۲ تا ۳ سال بررسی قرابت آنتی ژنیستی ویروس های در گردش با ویروس های واکسینال انجام شود. درمورد کانون های درگیر چنین به نظر می رسد که طبق گزارش اداره کل دامپزشکی استان، تعداد کانون های مشکوک (براساس علائم بالینی و ارسال نمونه) از تعداد متناسبی برخوردار می باشند و آنچه از بروز بیماری طی ۱ سال رخ داده طبق موارد قابل انتظار بوده است. این امر تأیید کننده نتایج حاصل از مطالعه حاضر می باشد که بنابر بررسی ژنتیکی و آنتی ژنتیکی واکسن مصرفی ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدرت محافظتی مناسبی را نشان داده است.

نکته قابل ذکر این است که OIE بر انجام واکسیناسیون جمعیت گاوی تأکید می کند و معتقد است با کنترل بیماری در گاو، بیماری در جمعیت گوسفندی خودبه خود کنترل می شود، اما علی رغم این توصیه باید توجه کرد که در کشور ما جمعیت نشخوارکنندگان کوچک حدوداً ۱۰ برابر جمعیت گاوی است و به علت فرهنگ دامداری در منطقه و وجود دام های عشایری، می بایست برای جمعیت گوسفندی و واکسیناسیون آن اهمیتی ویژه قائل شد. باید توجه کرد که گوسفند و بز می توانند 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 می باشند (۱، ۴). اگرچه اولویت برنامه کنترلی بر روی مایه کوبی سراسری در جمعیت گاو و گوساله متمرکز می باشد، به نظر می رسد به دلیل نقش گوسفند در اپیدمیولوژی بیماری اسکان عشایر و یا پوشش واکسیناسیون کامل جمعیت دامی آن ها 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 سال های ۲۰۲۱ و ۲۰۲۲ نتایج نشان داد این جدایه ها متعلق به زیرشاخه O/ME-SA/Ind-2001 می باشند. بنابراین با توجه به حرکت فرامرزی و جهانی ویروس O، به منظور توسعه استراتژی های به موقع و آماده سازی واکسن جهت مطابقت با تنوع ژنتیکی، یک برنامه مناسب برای نظارت بر بیماری تب برفکی در کشورهای دارای دامداری پیشرفته نیاز است (۱۴).

نتیجه گیری نهایی: درمورد کانون های درگیر در استان چنین به نظر می رسد که طبق گزارش اداره کل دامپزشکی تعداد کانون های مشکوک (براساس علائم بالینی و ارسال نمونه) از تعداد متناسبی برخوردار می باشد و آنچه از بروز بیماری طی ۱ سال رخ داده، قابل انتظار بوده است. این امر تأیید کننده نتایج حاصل از مطالعه حاضر است که واکسن مصرفی ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدرت محافظتی مناسبی در استان نشان داده است.

سپاسگزاری

از اعضای محترم کمیته علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی جهت تصویب طرح مشترک با اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی و آقای سیادت فر تشکر و قدردانی می گردد.

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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1201578)
3. Knowles. FAO World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease. England, Pirbright. 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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1155/2023-3761703)
9. Knowles. FAO World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease. England, Pirbright.WRLMEG.2023; Pirbright.England.
10. Zibae 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.3390/v15030598)