DOI: 10.22055/IVJ.2022.264841.2339
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.15.2

# بررسی وضعیت آلودگی به *هرپس ویروس اسبی نوع ۱* در اسبان استان خوزستان

علیرضا قدردان مشهدی[۱*]، رضا مکوندی[۲]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۳]
و مهدی پورمهدی‌بروجنی[۴]

[۱] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] دانش‌آموخته دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۴] استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۱

## چکیده

*هرپس ویروس اسبی نوع ۱*، یک ویروس DNA دار است که توزیع جهانی داشته و می‌تواند با خسارات اقتصادی قابل توجهی همراه باشد. اگرچه این ویروس واجد واگیری متوسطی است اما به واسطه توانایی در ایجاد آلودگی مخفی در بدن میزبان، می‌تواند به دنبال فعال شدن، یک خطر بالقوه برای اسبان گله به حساب آید. مهم‌ترین سندرم‌های بالینی ایجاد شده توسط این ویروس، درگیری تنفسی، سقط، میلوآنسفالوپاتی و ایجاد بیماری در نوزادان می‌باشد. در مطالعه حاضر که با استفاده از آزمایش PCR روی ۱۵۰ رأس اسب نگهداری شده در ۵ شهرستان استان خوزستان (شامل اهواز، شوشتر، شوش، رامهرمز و ماهشهر) صورت گرفت، هیچ مورد مثبتی از حضور DNA این ویروس در خون دام‌های مورد بررسی به ثبت نرسید. این یافته نشان دهنده وضعیت قابل قبول اسبان منطقه از نظر حضور این ویروس در زمان انجام تحقیق است. از مقایسه نتایج تحقیق حاضر با سایر تحقیقات مشخص می‌شود که میزان حضور *EHV-1* در اسبان مطالعات مختلف بسیار متفاوت است. به نظر می‌رسد که علت این امر صرف نظر از تفاوت در میزان واقعی آلودگی در مناطق و گله‌های مختلف، به نوع نمونه، وجود یا عدم وجود نشانه‌های بالینی (مرتبط با این ویروس) در دام نمونه‌گیری شده و روش آزمایشگاهی به کار رفته نیز مرتبط باشد.

**کلمات کلیدی:** اسب، خوزستان، *هرپس ویروس اسبی نوع ۱*، PCR

## مقدمه

هرپس‌ویروس‌های اسبی از جمله بااهمیت‌ترین ویروس‌هایی هستند که می‌توانند به عنوان عوامل بیماری‌زا، اسب سانان را درگیر سازند (Bryans and Allen 1989). در بین انواع هرپس‌ویروس‌های اسبی، *EHV-1* نه تنها اولین عضو شناسایی شده این گروه به حساب می‌آید بلکه به دلیل گسترش جهانی و توانایی در ایجاد اشکال بالینی متفاوت، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Slater, 2014).

*نویسنده مسئول : علیرضا قدردان مشهدی، استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: a.ghadrdan@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

*هرپس ویروس اسبی نوع ۱* به تحت خانواده آلفاهرپس ویرینه و جنس واریسلوویروس تعلق دارد (Slater, 2014). این هرپس ویروس که به نام ویروس سقط اسب نیز شناخته می‌شود برای اولین بار در سال ۱۹۳۳ از جنین سقط شده، جداسازی گردیده است (Dimock and Edward, 1933).

اگرچه در میان اعضا متعلق به جنس واریسلوویروس، تمایل به رشد در طیفی از سلول‌های مختلف وجود داشته، برخی از آن‌ها نروتروپ و برخی لنفوتروپ هستند؛ اما *EHV-1* با وضعیتی حد واسط، در چرخه حیات خود، به هر دو بافت تمایل دارد (Slater, 2014). همچنین این ویروس می‌تواند سلول‌های تنفسی و سلول‌های اندوتلیوم را در کنار سلول‌های عصبی و لنفوئیدی آلوده سازد (Smith et al, 2001).

*هرپس ویروس اسبی نوع ۱* از نظر ژنتیکی با ثبات است و در بین سویه‌های متفاوت آن کمتر از ۱ درصد تفاوت ژنتیکی به چشم می‌خورد، اما در عین حال واریانت‌های ژنتیکی از آن به دست آمده که ویژگی‌های بیولوژیک متفاوتی را دارا می‌باشند (Nugent et al, 2006). بر اساس بررسی‌های ژنتیکی، واریانت‌های ویروس به دو واریانت N752 و D752 تقسیم‌بندی می‌شوند. واریته N752 را عامل سقط و D752 را عامل بیماری نورولوژیک می‌دانند (Burgess et al, 2012).

واریته D752، از تعداد بیشتری اسب مبتلا به میلوآنسفالیت جدا شده و آلودگی با آن، خطر میلوآنسفالوپاتی را در مقایسه با N752، ۱۶۰ برابر افزایش می‌دهد بنابراین ارتباط بین افزایش خطر میلوآنسفالوپاتی و D752 مورد تأکید قرار گرفته است (Pronost et al, 2012).

در بین اسبان فاقد نشانه بالینی، واریانت N752 فراوان‌ترین واریته به حساب می‌آید. در عین حال اسبان آلوده با N752 نیز می‌توانند در ۲۵ درصد موارد، به میلوآنسفالوپاتی ناشی از *هرپس ویروس نوع ۱* اسب (EHM) مبتلا گردند (Perkins et al, 2009).

اسب‌ها می‌توانند به صورت همزمان به هر دو واریته آلوده شوند و در برخی موارد اشکال متفاوتی از بیماری را نشان دهند. برای مثال در یک بررسی از ۱۵۳ رأس اسب که به دلایلی غیر از بیماری‌های ناشی از هرپس‌ویروس‌ها مرده بودند، در ۹ رأس یکی از دو واریته و در ۱۲ رأس هر دو واریته ویروس، از گانگلیون عصب سه قلوی آن‌ها جداسازی شده است (Pusterla et al, 2010).

سندرم‌های بالینی شکل گرفته به واسطه *EHV-1* (همچون بیماری تنفسی، سقط و اختلالات عصبی) می‌تواند خسارات اقتصادی قابل توجهی را به صنعت نگهداری اسب وارد سازند (Slater, 2014). خسارات اقتصادی نه تنها به دلیل تلفات احتمالی یا سقط، بلکه به هزینه‌های درمان و مراقبت‌های بهداشتی، از دست رفتن روزهای تمرین و یا ناتوانی جهت شرکت در مسابقات نیز نسبت داده می‌شود (Constable et al, 2017).

علی‌رغم اهمیت *هرپس ویروس اسبی نوع ۱* و مواجهه با موارد بالینی مشکوک مرتبط به آن، مطالعات صورت گرفته در سطح کشور و به ویژه استان خوزستان در مورد این ویروس، بسیار محدود می‌باشد.

با عنایت به آن که استان خوزستان یکی از قطب‌های نگهداری و پرورش اسبان با ارزش کشور به حساب آمده و همچنین هر ساله به واسطه برگزاری مسابقات مختلف مرتبط با اسب، میزبان تعداد قابل توجهی از اسبان سایر نقاط کشور می‌باشد، ارزیابی وضعیت آلودگی به این ویروس در اسبان این منطقه، مفید به نظر می‌رسد.

در مطالعه پیش رو احتمال حضور عفونت نهفته *هرپس ویروس اسبی نوع ۱* در اسبان استان خوزستان با بهره‌گیری از روش PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش کار

در این مطالعه، ۱۵۰ رأس اسب نگهداری شده در تعدادی از باشگاه‌های موجود در شهرهای مختلف استان خوزستان شامل اهواز، شوشتر، شوش، رامهرمز و ماهشهر مورد بررسی قرار گرفتند. در هر یک از شهرهای فوق، به ترتیب ۴، ۷، ۶، ۴ و ۴ اسبداری ارزیابی گردیده و تعداد

اسب نمونه‌گیری شده نیز به ترتیب ۴۰، ۳۰، ۳۰، ۳۰ و ۲۰ رأس بود. در زمان مراجعه به هر اسب‌داری، پس از اخذ و ثبت اطلاعات مورد نیاز، خون‌گیری از ورید وداج با استفاده از سرنگ انجام می‌شد. خون‌های به دست آمده به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (سیترات) انتقال یافته و در اولین زمان ممکن به آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال می‌یافت.

در Table 1 وضعیت سن، جنس، آبستنی و سابقه بیماری دام‌های مورد مطالعه نشان داده شده است. وضعیت آبستنی مربوط به مادیان‌های با سن ۳ سال به بالا می‌باشد.

**Table 1: Characteristics of the sampled horses**

| | | |
|---|---|---|
| Age | < 6 months | 7 |
| | 6 months ≤ age < 3 years | 56 |
| | ≥ 3 years | 87 |
| Gender | Male | 54 |
| | Female | 96 |
| Pregnancy status of mares | Pregnant | 43 |
| | Non- pregnant | 24 |
| Disease background | Respiratory signs | 45 |
| | Abortion | 9 |
| | Neurological Signs | 5 |

جهت انجام جداسازی و کشت لکوسیت‌های خونی در حضور میتوژن، نمونه‌های خون پس از رسیدن به آزمایشگاه و تا زمان رسوب گلبول‌های قرمز، در دمای محیط نگهداری می‌شدند. سپس مایع پلاسما (به عنوان بخش غنی از لکوسیت خون) با استفاده از پیپت پاستور استریل، برداشت و به لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری استریل انتقال می‌یافت. این نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل (لکوسیت‌های خونی) دو بار با بافر سالین فسفات شستشو می‌گردید. پس از مخلوط کردن رسوب سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی RPMI، لکوسیت‌ها، شمارش می‌شدند. در مرحله بعد لکوسیت‌ها به نسبت یک میلیون سلول در میلی‌لیتر، در محیط کشت سلولی RPMI حاوی میتوژن مخلوط و به حفرات پلیت کشت سلولی ۲۴ حفره‌ای انتقال می‌یافتند. میتوژن به کار رفته در این تحقیق، فیتوهماگلوتینین (شرکت اینویتروژن، آمریکا) بود که طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده بایستی ۱۵ میکرولیتر از آن به هر میلی‌لیتر از محیط کشت سلولی، اضافه گردد. پلیت‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $CO_2$ با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت. سپس محیط کشت داخل حفرات به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و لکوسیت‌ها با بهره بردن از سانتریفیوژ، ترسیب می‌شدند. در آخرین مرحله، لکوسیت‌های رسوب یافته در ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی سلول‌ها مخلوط و تا زمان استخراج DNA در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

استخراج DNA از لکوسیت‌های خونی کشت یافته در حضور میتوژن فیتوهماگلوتیین با بهره‌گیری از یک کیت تجاری استخراج DNA (شرکت یکتا تجهیزآزما، ایران) دارای ستون‌های فیلتر سیلیکا و طبق دستورالعمل کیت انجام شد. کیفیت و کمیت DNA های استخراج شده توسط الکتروفورز در ژل آگارز و دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت. همچنین کیفیت DNA های استخراج شده برای استفاده در آزمایش PCR با انجام PCR به وسیله پرایمرهای اختصاصی ژن RNA ریبوزومال 18S(18SU و 18SD)که قادر به تکثیر یک قطعه 488 bp از ژن کد کننده RNA ریبوزومی 18S بسیاری از پستانداران از جمله اسب می‌باشند، تأیید گردید.

پس از استخراج DNA از گلبول‌های سفید، آزمایش PCR با استفاده از یک زوج پرایمر اختصاصی EHV-1 ( Carvalho et al, 2000) که توالی آن‌ها در Table 2 نشان داده شده است، به انجام رسید.

**Table 2: Nucleotide sequence of primers used for detection of EHV-1 (Carvalho et al, 2000)**

| | |
|---|---|
| Forward primer | ATGGCACTGGCTCCGCTGCCGC |
| Reverse primer | CTGGCGAGAACGCTACCC |

هر واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر و شامل اجزایی زیر بود: ۱ میکرولیتر DNA (تقریباً ۰/۱۵ میکروگرم) استخراج شده از لکوسیت‌ها خونی، ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master mix (شرکت آمپلیکون، دانمارک) با غلظت 2X، ۰/۵ میکرولیتر (۷/۵ پیکومول) از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس در این آزمایش از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده از واکسن کشته سه‌گانه *EHV-1/ EHV-4/Equine Influenza* (Calvenza®-03 شرکت Boehringer Ingelheim GmbH، آلمان) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برنامه حرارتی این آزمایش عبارت بود از: یک مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳/۵ دقیقه در دمای ۹۵°C، ۶ چرخه تکثیر شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۰°C به مدت ۲۰ ثانیه (در هر سیکل، ۱ درجه سانتی‌گراد کاهش دما) و ۷۲°C به مدت ۲۰ ثانیه و سپس ۳۹ چرخه تکثیر شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۴°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۲۰ ثانیه و در پایان یک مرحله طویل-سازی نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. پس از اتمام آزمایش، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR به‌آرامی درون چاهک‌های یک ژل آگارز ۲/۵ درصد، بارگذاری و در کنار کنترل‌های مثبت و منفی و نردبان ژنی ۱۰۰ bp الکتروفورز شدند. انتظار می‌رفت آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای مذکور منجر به ساخت یک قطعه DNA با طول ۲۶۸ bp گردد.

## نتایج

### استخراج DNA

در Figure 1، DNA استخراج شده از تعدادی از نمونه‌های خون، پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داده شده است. وجود یک باند DNA با طول بسیار زیاد که به کندی در ژل آگارز حرکت می‌کند، نشان‌گر کیفیت مطلوب DNA استخراج شده می‌باشد.

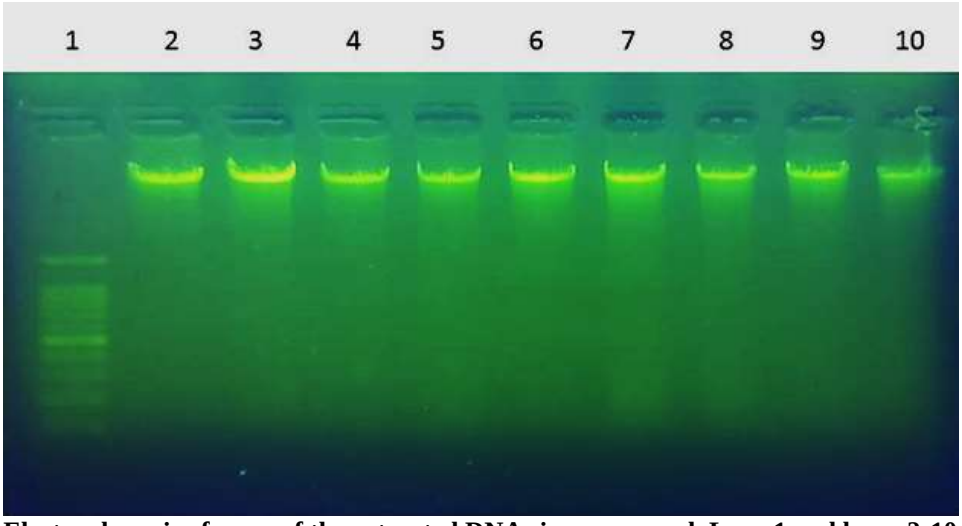


**Figure 1: Electrophoresis of some of the extracted DNAs in agarose gel. Lane 1 and lanes 2-10 represent 100bp DNA ladder and extracted DNAs respectively**

### نانودراپ

برای به دست آوردن تقریبی غلظت DNA های استخراج شده، غلظت آن‌ها در ۱۰ نمونه، با استفاده از دستگاه نانودراپ و در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی گردید (Table 3). همچنین برای پی بردن به خلوص و کیفیت DNA های استخراج شده، نسبت OD، ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر DNA نیز محاسبه گردید. نسبت ۲–۱/۸ بیان‌گر خلوص مناسب DNA به دست آمده، می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل، غلظت DNA های استخراج شده به طور متوسط ۱۲۲/۹۹ نانوگرم در هر میکرولیتر بوده است.

**Table 3: Concentration and $OD_{260}$:$OD_{280}$ ratio of some of the extracted DNAs**

| OD260:OD280 ratio | ng/µl | samples |
|---|---|---|
| 1.82 | 66.4 | 1 |
| 1.87 | 97.6 | 2 |
| 1.85 | 114.9 | 3 |
| 1.89 | 365 | 4 |
| 1.82 | 107 | 5 |
| 1.85 | 111.1 | 6 |
| 1.85 | 172 | 7 |
| 1.82 | 66 | 8 |
| 1.8 | 65.2 | 9 |
| 1.8 | 64.7 | 10 |

**نتایج آزمایش PCR با پرایمرهای ژن RNA ریبوزومال**

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده RNA ریبوزومی S ۱۸ یوکاریوتی نشان داد که DNA های استخراج شده از نمونه‌های خون از کیفیت لازم برای PCR برخوردار بودند. در Figure 2، محصول PCR ژن RNA ریبوزومال با طول ۴۸۸ bp، نشان‌گر مثبت بودن نتیجه آزمایش PCR می‌باشد.

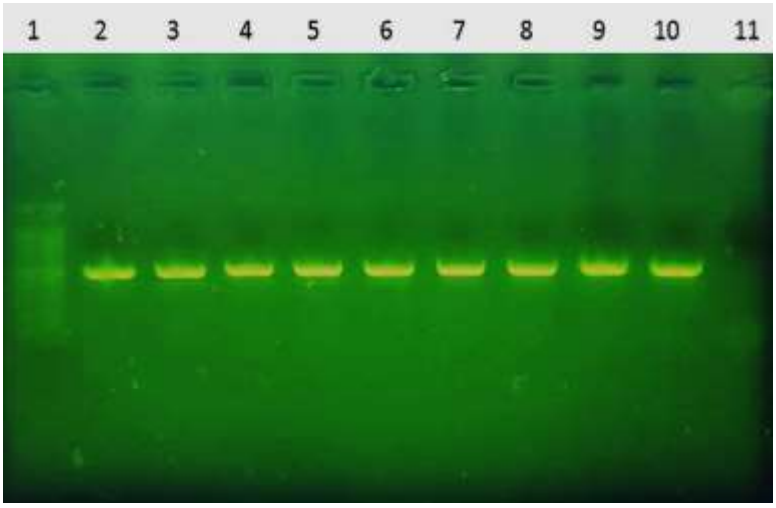


**Figure 2: Evaluation of extracted DNA by PCR, using 18s ribosomal RNA specific primers. Lanes 1 and 11 represent 100bp DNA ladder and negative control respectively. Lanes 2-10 indicate amplification of an expected DNA band of 488bp for all DNA samples**

**نتایج آزمایش PCR جهت ردیابی اسیدنوکلئیک *EHV-1* در نمونه‌های DNA**

تمام ۱۵۰ نمونه مورد مطالعه، از نظر وجود DNA *هرپس ویروس اسبی نوع ۱*، منفی تشخیص داده شدند. در حالی که همواره آزمایش PCR بر روی DNA استخراج شده از واکسن سه گانه مورد استفاده به عنوان کنترل مثبت، منجر به ساخت یک قطعه DNA با طول قابل انتظار ۲۶۸bp می‌گردید.

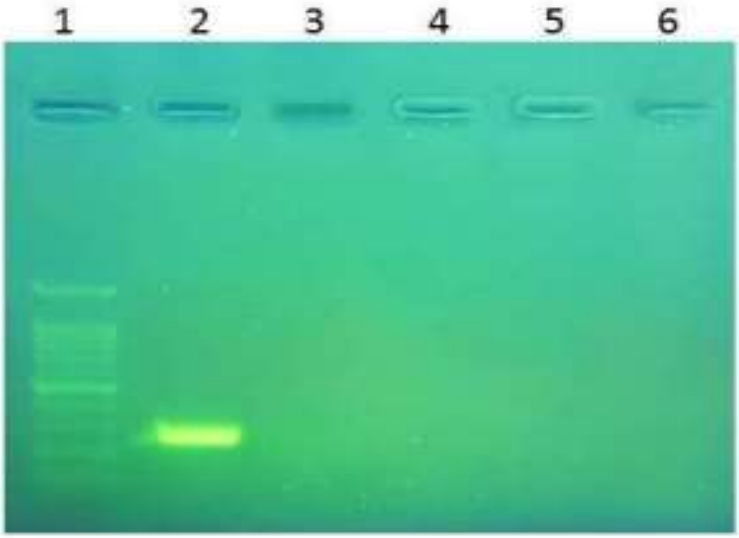


**Figure 3: The results of PCR using EHV1 specific primers. Lanes 1-3 represent 100bp DNA Ladder, positive control (*EHV-1/ EHV-4/Equine Influenza* vaccine) and negative control, respectively. Lanes 4-6 indicate the negative results of some of the DNA samples**

## بحث

همان طور که پیش از این در قسمت مقدمه نیز ذکر گردید، در سال‌های اخیر ظن وجود اشکالی از درگیری با *هرپس ویروس اسبی نوع ۱*، به خصوص شکل کشنده و بدخیم میلوآنسفالوپاتی در مناطقی از کشور مطرح گشته، در تعدادی از این موارد، حضور *EHV-1* نیز مورد تأیید قرار گرفته است. برای مثال از مهر تا آذر سال ۱۳۹۱ چندین اسب مشکوک به EHM، در شهرستان گلپایگان مورد معاینه قرار گرفتند. در این شهرستان از بین ۲۸ رأس اسب نگهداری گردیده در یک باشگاه سوارکاری، ۱۷ رأس اسب تروبرد ۶ تا ۱۱ ساله واجد نشانه‌های عصبی بوده که ۹ رأس از آنان تلف شدند. نمونه‌های به دست آمده از دو رأس دام تلف‌گردیده جهت تلقیح به تخم‌مرغ جنین‌دار و کشت سلول مورد استفاده قرار گرفت و مشخص شد که ویروس مورد نظر توانایی رشد در جنین تخم‌مرغ و ایجاد CPE در تیره سلولی RBK را دارا می‌باشد. پس از انجام PCR روی نمونه‌های خون به دست آمده از تعدادی از اسبان درگیر، حضور *EHV-1* تأیید گردید (Bazargani et al, 2014).

قابل توجه آن که پیش و پس از تاریخ فوق، وجود موارد بالینی مشکوک به EHM (بدون اثبات حضور ویروس) در خوزستان نیز مورد ظن نویسندگان قرار گرفته است. با عنایت به مجموعه مطالب فوق و اهمیت پاسخ به این سؤال که آیا *EHV-1* در بین اسبان منطقه، به خصوص به شکل نهفته حضور دارد یا خیر، تحقیق حاضر به انجام رسید.

لازم به ذکر است که نهفته بودن ویروس و باز فعال شدن آن از ویژگی‌های کلیدی اپیدمیولوژیک آن به حساب می‌آید (Welch et al, 1992). به دلیل همین ویژگی، جمعیت بالای از اسبان بهبود یافته، ویروس را برای مدت طولانی و حتی در تمام طول عمر حفظ کرده (Welch et al, 1992)، به عنوان مخزن عمل نموده و می‌توانند به صورت دوره‌ای، فعال و از طریق ترشحات تنفسی، *EHV-1* را دفع نماید (Slater, 2014). این امر باعث آلودگی اسبان مستعد می‌گردد. استرس‌هایی همچون حمل و نقل و از شیر گرفتن نیز می‌توانند به فعال شدن عفونت پنهان منجر شده و تبعات بالینی و اپیدمیولوژیک بعدی را به همراه آورند (Slater et al, 1994).

شناسایی آلودگی با هرپس ویروس‌ها به روش‌های مختلف امکان‌پذیر است که در این بین PCR از ارزش ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. گفته می‌شود که با بهره گرفتن از این روش، می‌توان حضور ویروس در سلول اسبان درگیر به شکل نهفته آلودگی را شناسایی نمود (Slater, 2014).

در مطالعه حاضر که با استفاده از آزمایش PCR روی ۱۵۰ رأس اسب نگهداری شده در ۵ شهرستان استان خوزستان صورت گرفت، هیچ مورد مثبتی از حضور DNA *هرپس ویروس نوع ۱* به ثبت نرسید. میزان آلودگی به *EHV-1* در مطالعات مختلف، متفاوت اعلام گردیده است:

در یک مطالعه در کشور ژاپن، که در فاصله سال‌های ۱۹۷۹ تا ۱۹۹۰روی ۳۳۲۶ رأس اسب انجام شد، ۴۲ سویه از این ویروس از سوآپ‌های بینی و یا پلاسمای اسب‌ها جدا گردید. این جداسازی تنها در فصل زمستان و در طی همه‌گیری‌های درگیری تنفسی صورت گرفت. همچنین ۸۷ سویه ویروس، از جنین‌های سقط شده، به دست آمد. در این بررسی از کشت سلولی برای جداسازی ویروس و از AGID برای تعیین هویت جدایه‌ها استفاده گردیده است (Matsumura et al, 1992).

نتایج تحقیق انجام شده با بهره بردن از روش PCR در بریتانیا که در سال ۱۹۹۴ به چاپ رسیده است، نشان می‌دهد که عقده‌های لنفاوی ۶۰ درصد از ۴۰ رأس اسب کشتار شده، واجد *EHV-1* یا *EHV-4* بوده است (Edington et al, 1994).

در مطالعه صورت گرفته در طی یک دوره سه ساله در کانادا، مشخص گردید که ۲۰ درصد از اسبان تروبرد مسابقه‌ای، دارای نشانه‌های درگیری قسمت‌های فوقانی دستگاه تنفس بوده‌اند. در ۵ تا ۱۸ درصد از اسبان فوق، افزایش عیار آنتی‌بادی علیه *EHV-1* در زمان انجام آزمایش خنثی‌سازی ویروس، مشاهده گردید (Carman et al, 1997).

در سال ۱۹۹۸ در یکی از باشگاه‌های آموزش سوارکاری ایالت ویرجینیای آمریکا، نشانه‌های عصبی (همچون عدم تعادل و فلجی) در ۱۹ رأس از ۴۶ رأس اسب نگهداری شده در این محل، مشاهده گردید. آلودگی با *EHV-1* در دام‌های درگیر، با استفاده از روش‌های سرولوژیک به اثبات رسید (Friday et al 2000).

در تحقیق دیگر انجام شده در نیوزلند، با استفاده از روش ELISA، ۶۳ درصد از ۸۲ رأس اسب به ظاهر سالم یا با نشانه‌های درگیری قسمت‌های ابتدایی دستگاه تنفس، دارای آنتی‌بادی علیه *EHV-1* بوده‌اند (Dunowska et al, 2002).

در سال ۲۰۰۸، محققین آمریکایی با هدف شناسایی اسبانی که به صورت پنهان واجد آلودگی به *EHV-1* هستند، مطالعه‌ای را روی عقده‌های لنفاوی ۱۳۲ رأس اسب (که به دنبال کالبدگشایی در اختیار آنان قرار گرفته بود) با استفاده از روش Nested-PCR به انجام رسانده و نشان دادند که DNA ویروس *EHV-1* در ۵۴ درصد نمونه‌ها وجود داشته است. این محققین اعلام نمودند که سویه‌های نوروپاتوژنیک *EHV-1* به میزان قابل توجهی در جمعیت مادیان‌های تروبرد در کنتاکی مرکزی وجود داشته و خطری با اهمیت برای صنعت اسب ایالت متحده آمریکا به حساب می‌آید (Allen et al, 2008).

در یک بررسی روی ۵۰۴ رأس از اسب‌سانان نگهداری شده در کشور ترکیه، میزان حضور *EHV-1* در ۴۰ رأس دام واجد نشانه‌های تنفسی با بهره بردن از Nested PCR تعیین گردید. نتایج نشان داد که ۱۳ سوآپ از مجموع ۴۰ سوآپ تهیه شده و ۳ بافی کت از مجموع ۲۱ نمونه خون اخذ گردیده، واجد DNA این ویروس بوده است (Ataseven et al, 2009).

در یک مطالعه پس از مرگ روی لاشه ۷۰ رأس اسب مسابقه‌ای، در ۲۶ درصد موارد حداقل در یکی از غدد لنفاوی تحت‌فکی یا برونشیال و یا گانگلیون‌های عصب سه‌قلو، ژن مربوط به ویروس فوق یافت گردیده است (Pusterla et al, 2010).

در تحقیق انجام شده در حدفاصل نوامبر سال ۲۰۱۱ تا ژانویه سال ۲۰۱۲ در آناتولی ترکیه، نمونه خون ۱۵۰ رأس اسب غیرواکسینه از نظر حضور آنتی‌بادی علیه ویروس

*EHV-1* مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی ۳۴/۶۶ درصد نمونه‌ها از نظر وجود آنتی‌بادی مثبت بوده و میزان آلودگی در مناطق مختلف این بخش از کشور ترکیه، متفاوت اعلام گردیده است (Avci et al, 2014).

ارزیابی‌های کشتارگاهی در کشور نیوزیلند نیز دلالت بر آن دارد که در عقده‌های لنفاوی ۳۲/۷ درصد اسبان مورد بررسی، DNA ویروس وجود داشته است (Dunowska et al, 2015).

تحقیق صورت گرفته در کشور آمریکا روی ۴۰۰۰ رأس اسب واجد نشانه‌های تنفسی یا عصبی و یا تب، مشخص نمود که در ۱۱۷ مورد از نمونه‌های سوآپ یا خون اخذ شده، آثار *EHV-1* قابل شناسایی بوده و در ۲۳ مورد نیز در هر دو نمونه (سوآپ و خون) این ویروس یافت گردیده است. روش آزمایشگاهی به کار رفته در این تحقیق PCR بوده است (Pusterla et al, 2015).

در یک مطالعه در کشور اتیوپی که روی ۱۶۰ رأس از اسب سانان واجد نشانه‌های درگیری تنفسی انجام شد، میزان شیوع انواع هرپس ویروس اسبی تعیین گردید. نتایج این تحقیق میزان حضور *EHV-1* (۷/۵ درصد) را کم‌تر از *EHV-2*، *EHV-4* و *EHV-5* نشان داد. ضمن این که در ۱۱۱ رأس دام فاقد نشانه‌های بالینی، اثری از این ویروس نبود. روش به کار رفته در این تحقیق نیز PCR اعلام گردیده است (Negussie et al, 2017).

در تحقیق صورت گرفته در کشور استرالیا روی اسبان تروبرد، میزان حضور آنتی‌بادی در بالغین، کره‌ها و اسبان مسابقه‌ای ۲ سال، به ترتیب ۹ تا ۲۸ درصد، ۱۱ درصد و ۴۶–۶۸ درصد بوده است (Constable et al, 2017).

در سال‌های اخیر، مطالعه در مورد *EHV-1* در کشور ما نیز مورد توجه گروهی از محققین قرارگرفته است:

در بررسی صورت گرفته توسط Sarani و همکاران در سال ۲۰۱۳، هیچ یک از ۲۰۰ رأس اسب نگهداری شده در شمال شرق کشور واجد DNA *هرپس ویروس اسبی نوع ۱* نبودند. آزمایش به کار رفته در این تحقیق real-time PCR بوده است.

تحقیق انجام شده در استان‌های شهرکرد و اصفهان در سال ۲۰۱۴ نشان داد که در این دو استان، میزان موارد مثبت آزمایش PCR از نظر حضور DNA این ویروس به ترتیب ۱۰/۸ و ۱۸/۸ درصد بوده است (Taktaz Hafshejani et al, 2015).

Raoofi و همکاران با مطالعه نمونه‌های خون و سوآپ بینی ۱۵۰ رأس اسب از چهار استان تهران، گلستان، آذربایجان غربی و خوزستان (نمونه‌ها تنها محدود به شوش و دزفول بوده است) به روش real-time PCR میزان حضور DNA *هرپس ویروس اسبی نوع ۱* را در نمونه‌های فوق را ۹/۳۳ درصد اعلام نمودند (Raoofi et al, 2020).

از مقایسه نتایج تحقیقات فوق با هم و با بررسی حاضر نکته پیش گفته تأیید می‌گردد که میزان حضور *EHV-1* در اسبان مطالعات مختلف، بسیار متفاوت است. به نظر می‌رسد که علت این امر صرف نظر از تفاوت در میزان واقعی آلودگی در مناطق و گله‌های مختلف، به نوع نمونه، وجود یا عدم وجود نشانه‌های بالینی (مرتبط با این ویروس) در دام نمونه‌گیری شده و روش آزمایشگاهی به کار رفته نیز مرتبط باشد. برای مثال با یک روش آزمایشگاهی یکسان (PCR)، زمانی که نمونه‌های حاصل از کالبدگشایی یا نمونه‌های کشتارگاهی مورد استفاده قرار گرفته، میزان آلودگی قابل توجه و ۶۰ درصد (Edington et al, 1994)، ۵۴ درصد (Allen et al, 2008) و ۲۶ درصد (Pusterla et al, 2010) بوده است. در حالی که اعمال همین روش در نمونه خون دام‌های سالم به اعداد ۱۰/۸ درصد (Taktaz Hafshejani et al, 2015) و ۹/۳۳ درصد (Raoofi et al, 2020) منجر گشته است.

قابل توجه آن که ارزیابی تعدادی اسب درگیر با روش یکسان اما با دو نوع نمونه مختلف نیز می‌تواند نتایج متفاوتی را به همراه داشته باشد. برای مثال (همان طور که پیش از این گفته شد)، در بررسی به عمل آمده در ترکیه، در حالی که ۳۲/۵ درصد از نمونه‌های سوآپ بینی، واجد *EHV-1* بودند این رقم در مورد بافی‌کت ۱۴/۳ اعلام گردیده است (Ataseven et al, 2008).

با عنایت به آن که مورد مثبتی از وجود آلودگی به *هرپس ویروس اسبی نوع ۱* در اسبان این مطالعه مشاهده نگردید، بحث در مورد نقش عوامل خطر در میزان آلودگی غیر-ضروری به نظر می‌رسد.

در مجموع می‌توان گفت، نبود هیچ مورد مثبت از آلودگی به *EHV-1* در دام‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که ظاهراً وضعیت اسبان منطقه در زمان انجام تحقیق، از نظر حضور این ویروس با اهمیت قابل قبول می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان سپاسگزار همکاری ارزشمند کارشناسان محترم بخش‌های داخلی دام‌های بزرگ و ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز هستند.

## تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

## منابع مالی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه‌ی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی در دانشگاه شهید چمران انجام گرفت و هزینه اجرای آن در قالب پژوهانه (گرنت) پرداخت شد. لذا نویسندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

Allen, G., Bolin, D., Bryant, U., Carter, C., Giles, R., Harrison, L., Hong, C., Jackson, C., Poonacha, K., & Wharton, R. (2008). Prevalence of latent, neuropathogenic *equine herpesvirus-1* in the Thoroughbred broodmare population of central Kentucky. *Equine veterinary journal* 40(2): 105-110.

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. *Research in veterinary science* 86(2): 339-344.

Avci, O., Yavru, S., Tokgoz, S., & Kale, M. (2014). Detection of Antibodies against *Equine Herpes Virus-1* and *Equine Herpes Virus-4* in Horses in Southeast Anatolia by Indirect Elisa. *Acta Scientiae Veterinariae* 42(1): 1-6.

Bryans, J. T., & Allen, G. P. (1989). Herpesviral diseases of the horse. In: G. Wittmann. *Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs* (pp. 176-229). Massachusetts Kluwer Academic Publisher.

Burgess, B., Tokateloff, N., Manning, S., Lohmann, K., Lunn, D., Hussey, S., & Morley, P. (2012). Nasal Shedding of *Equine Herpesvirus-1* from Horses in an Outbreak of Equine Herpes Myeloencephalopathy in Western Canada. *Journal of veterinary internal medicine* 26(2):384-392.

Carman, S., Rosendal, S., Huber, L., Gyles, C., McKee, S., Willoughby, R. A., Dubovi, E., Thorsen, J., & Lein, D. (1997). Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9(1):17-23.

Carvalho, R., Passos, L., & Martins, A. (2000). Development of a differential multiplex PCR assay for *equine herpesvirus 1 and 4* as a diagnostic tool. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 47(5):351-359.

Constable, P. D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H. & Grunberg, w. (2017). *Veterinary Medicine* (11th edition). Elsevier. Missouri. Pp: 1040-1043, 1270-1282.

Dimock, W., & Edwards, P. (1933). Is there a filterable virus of abortion in mares? *Kentucky Agricultural Experiment Station Bulletin* 333(Suppl), 297-301.

Dunowska, M., Gopakumar, G., Perrott, M., Kendall, A., Waropastrakul, S., Hartley, C., & Carslake, H. (2015). Virological and serological investigation of *Equid herpesvirus 1* infection in New Zealand. *Veterinary microbiology* 176(3-4):219-228.

Dunowska, M., Wilks, C., Studdert, M., & Meers, J. (2002). Viruses associated with outbreaks of equine respiratory disease in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 50(4):132-139.

Edington, N., Welch, H., & Griffiths, L. (1994). The prevalence of latent equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine veterinary journal* 26(2):140-142.

Friday, P. A., Scarratt, W. K., Elvinger, F., Timoney, P. J., & Bonda, A. (2000). Ataxia and paresis with *equine herpesvirus type 1* infection in a herd of riding school horses. *Journal of veterinary internal medicine* 14(2):197-201.

Matsumura, T., Sugiura, T., Imagawa, H., Fukunaga, Y., & Kamada, M. (1992). Epizootiological aspects of *type 1 and type 4 equine herpesvirus* infections among horse populations. *Journal of Veterinary Medical Science* 54(2):207-211.

Negussie, H., Gizaw, D., Tesfaw, L., Li, Y., Oguma, K., Sentsui, H., Tessema, T. S., & Nauwynck, H. J. (2017). Detection of *Equine Herpesvirus (EHV)-1, -2, -4 and-5* in Ethiopian Equids with and without Respiratory Problems and Genetic Characterization of *EHV-2* and *EHV-5* Strains. *Transboundary and emerging diseases* 64(6):1970-1978.

Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K., Mumford, J., Swann, Z., Newton, J., Bowden, R., Allen, G., & Davis-Poynter, N. (2006). Analysis of *equid herpesvirus 1* strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *Journal of virology* 80(8):4047-4060.

Perkins, G. A., Goodman, L. B., Tsujimura, K., Van de Walle, G. R., Kim, S. G., Dubovi, E. J., & Osterrieder, N. (2009). Investigation of the prevalence of neurologic *equine herpes virus type 1 (EHV-1)* in a 23-year retrospective analysis (1984–2007). *Veterinary microbiology* 139(3-4):375-378.

Pronost, S., Legrand, L., Pitel, P. H., Wegge, B., Lissens, J., Freymuth, F., Richard, E., & Fortier, G. (2012). Outbreak of equine herpesvirus myeloencephalopathy in France: A clinical and molecular investigation. *Transboundary and emerging diseases* 59(3):256-263.

Pusterla, N., Holzenkaempfer, N., Mapes, S., & Kass, P. (2015). Prevalence of *equine coronavirus* in nasal secretions from horses with fever and upper respiratory tract infection. *Veterinary Record* 177(11):289-289.

Pusterla, N., Mapes, S., & Wilson, W. (2010). Prevalence of *equine herpesvirus type 1* in trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes of equids examined postmortem. *Veterinary Record* 167(10):376.

Raoofi, A., Madadgar, O., Akbarein, H., & Tazikeh, A. (2020). Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of *Equine Herpes Virus-1* in Horses with History or Clinical Signs in Four Provinces of Iran. *Iranian Journal of Veterinary* 14(1): 27-35.

Sarani, A., Mohammadi, G. R., Mayameei, A., & Akbari, M. (2013). Investigation of *equine herpesvirus-1 and 4* infections in equine population of Iran by real-time PCR. *Human & Veterinary Medicine* 5(1): 29-33.

Slater, j. (2014). Equine herpesviruses. In: Selon, D. C. & Long, R. J. (Eds). *Equine infectious diseases* (2nd ed. PP:151-168). E. book Elsevier.

Slater, J., Borchers, K., Thackray, A., & Field, H. (1994). The trigeminal ganglion is a location for *equine herpesvirus 1* latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology* 75(8):2007-2016.

Smith, D., Hamblin, A., & Edington, N. (2001). Infection of endothelial cells with *Equine herpesvirus-1 (EHV-1)* occurs where there is activation of putative adhesion molecules: a mechanism for transfer of virus. *Equine veterinary journal* 33(2):138-142.

Taktaz Hafshejani, T., Nekoei, S., Vazirian, B., Doosti, A., Khamesipour, F., & Anyanwu, M. U. (2015). Molecular detection of *equine herpesvirus types 1 and 4* infections in healthy horses in Isfahan central and Shahrekord Southwest regions, Iran. *BioMed research international* Article ID 917854.

Taghipour Bazargani, T., Momtaz, H., Baharlo, F.R. & Ghafari, M. (2014). The first case report on myeloencephalopathy caused be *equine herpes virus type 1* in Iran. *Iranian veterinary journal* 10(3): 100-103. (in persian)

Welch, H. M., Bridges, C. G., Lyon, A. M., Griffiths, L., & Edington, N. (1992). Latent *equid herpesviruses 1 and 4*: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *Journal of General Virology* 73(2):261-268.

Received: 30.12.2020
Accepted: 02.03.2022

Vol. 19, No. 2, Summer, 2023 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.264841.2339
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.15.2

# A survey on *equine herpes virus-1* infection in horses of Khuzestan province

Ali Reza Ghadrdan Mashhadi[1*], Reza Makvandi[2], Masoud Reza Seyfi Abad Shapouri[3] and Mahdi Pourmahdi Boroujeni[4]

[1] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 30.12.2020 Accepted: 02.03.2022

## Abstract

*Equine Herpesvirus type 1* is a DNA virus with worldwide distribution which can cause noticeable economic loss. Although this virus is moderately contagious, after shedding, latent infection in the host can be considered as a potential risk for the other horses in the herd. The most important clinical syndromes caused by this virus are respiratory involvment, abortion, myeloencephalopathy and neonatal disease. The current study, using a PCR test on 150 horses in five cities in Khuzestan province (Ahvaz, Shooshtar, Shoosh, Ramhormoz and Mahshahr), reported no positive case about the presence of a DNA virus in the blood of the studied horses. This finding has shown that the presence of this virus in the horses from this region, at the time of performing the test, is justifiable. The results of this study vis-à-vis those of other studies show that the presence of *EHV-1* among horses in different studies is very dissimilar. Regardless of the difference between the actual infection rate in different regions and herds, the reason for this disparity is possibly related to the sample type, presence or absence of clinical signs (related to the virus) in the sampled horse, and the laboratory method used.

**Key words**: Horses, Khuzestan, *Equine Herpesvirus type 1*, PCR

[*] **Corresponding Author**: Ali Reza Ghadrdan Mashhadi**,** Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: a.ghadrdan@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).