"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2023.1977303.1391**

Study of prevalence of equine herpes virus types 1 and 4 infections in horse sera from riding clubs of Urmia

Shafaroodi, A.[1], Araghi-Sooreh, A.[2*]

1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
*Corresponding author's email: a.araghi@iaurmia.ac.ir
(Received: 2023\2\20 Accepted: 2023\6\14)

Abstract

Herpesviruses can cause significant economic losses to the equine industry worldwide. Equine herpes virus type 1 (EHV-1) and type 4 (EHV-4) cause respiratory signs, abortion, neonatal death and in some cases distal limb edema and myeloencephalopathy in susceptible horses. The aim of this study was to determine the seroprevalence of EHV-1 and EHV-4 infection in club horses of Urmia in relation to age, gender, breed and clinical signs. Sera from 51 horses were tested by indirect enzyme linked immunosorbent assay (iELISA) for detection of specific antibodies against EHV-1 and EHV-4 and data were analyzed by chi-squared, fisher's exact and logistic regression tests. A total of 9 samples (17.65%) (95% CI: 7.2-28.0) were found to be positive for specific antibodies of EHV-1 and EHV-4. Seropositivity was not affected by age (p=0.593), sex (p=0.651), breed (p=0.874) and clinical signs (p=0.824). Although in regression analysis it was found that odds of infection based on age was increased by 1.51% for every 4 year decrease in age and odds of infection was 1.549% more in females compared with males. Also age, gender and breed of horses explains 0.449, 0.437 and 0.217% of infection rate fluctuations, respectively. In conclusion, the results indicate relatively high exposure of equine herpes virus types 1 and 4 in club horses of Urmia.

Conflict of interest: None declared
Keywords: Equine herpes virus, Horse, indirect ELISA, Urmia.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1977303.1391

بررسی فراوانی آلودگی با تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی در سرم اسب‌های باشگاه‌های سوارکاری شهرستان ارومیه

امیر شفارودی[۱]، آرش عراقی‌سوره[۲*]

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۲-دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: a.araghi@iaurmia.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۳/۲۴)

چکیده

هرپس ویروس‌ها خسارات اقتصادی زیادی را به صنعت پرورش اسب در سراسر دنیا وارد می‌کنند. هرپس ویروس‌های ۱ و ۴ اسبی موجب درگیری تنفسی، سقط، مرگ و میر نوزادان و نیز در موارد نادر، باعث ادم اندام‌های حرکتی و میلوانسفالوپاتی در اسب‌های حساس می‌شوند. هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی فراوانی آلودگی سرمی با هرپس ویروس‌های ۱ و ۴ اسبی در اسب‌های باشگاهی شهرستان ارومیه با احتساب سن، جنس، نژاد و نشانه‌های بالینی بود. بدین منظور نمونه‌های سرمی مربوط به ۵۱ رأس اسب، به روش الایزای غیرمستقیم برای ردیابی پادتن‌های اختصاصی ضد هرپس ویروس‌های ۱ و ۴ اسبی آزمایش شده و داده‌های حاصله با استفاده از آزمون‌های کای‌دو، پیرسون، دقیق فیشر و رگرسیون لجستیک، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تعداد ۹ نمونه (۱۷/۶۵ درصد) (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۲۸/۰-۷/۲) واجد واکنش مثبت سرمی برای پادتن‌های اختصاصی هرپس ویروس ۱ و ۴ اسبی بودند و فراوانی سرمی مذکور، تحت تاثیر سن (p=۰/۵۹۳)، جنس (p=۰/۶۵۱)، نژاد (p=۰/۸۷۴) و نشانه‌های بالینی (p=۰/۸۲۴) قرار نداشت. البته در آنالیز رگرسیون مشخص شد که شانس آلودگی بر اساس سن با کاهش هر ۴ سال، ۱/۵۱ درصد افزایش می‌یابد و در اسب‌های ماده، ۱/۵۴۹ درصد بیشتر از اسب های نر می‌باشد. همچنین سن اسب‌ها ۰/۴۴۹ درصد، جنسیت اسب‌ها ۰/۴۳۷ درصد و نژاد اسب‌ها ۰/۲۱۷ درصد از تغییرات آلودگی را توجیه می‌کند. جمع‌بندی نهائی نتایج نشان از مواجهه نسبتاً بالای تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی با جمعیت اسب‌های باشگاهی شهر ارومیه دارد.

کلیدواژه‌ها: هرپس ویروس، اسب، الایزای غیرمستقیم، ارومیه.

مقدمه

تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی متعلق به خانواده هرپس ویریده و تحت خانواده آلفا هرپس ویرینه، واجد DNA دو رشته‌ایی خطی و از لحاظ ژنتیکی و آنتی‌ژنیکی، بسیار مشابهت دارند(Harless and Pusterla, 2006). عفونت ناشی از هرپس ویروس اسبی تیپ ۱ سبب طوفان سقط جنین و یا سقط‌های تکی در مادیان‌های آبستن، مرگ و میر زودرس کره‌های نوزاد و اختلال تنفسی ناشی از پنومونی بینابینی در اسب های جوان می‌گردد (Damiani *et al*., 2014) که در مورد عفونت با ژنوتیپ H_{752} آن، شاهد ادم اندام‌های حرکتی با نشانه‌های زودگذر عصبی هم خواهیم بود (Pusterla *et al*., 2021). همچنین میلوانسفالوپاتی از تظاهرات نسبتاً غیرمعمول آلودگی با تیپ ۱ هرپس ویروس اسبی می‌باشد (Burgess *et al*., 2012; Traub-Dargatz *et al*., 2013; Sutton *et al*., 2019). مدت زمان ظهور نشانه‌های عصبی که اغلب مادیان‌های بالای ۳ سال را درگیر می‌کند ۸ تا ۱۲ ساعت پس از بروز نشانه‌های تنفسی، برآورد شده‌است (Slatter, 2007). ترشحات بینی، تماس مستقیم، آیروسل‌ها، غذای آلوده و تماس با تجهیزات آلوده همگی نقش مهمی در گسترش این ویروس‌ها دارند (Walker *et al*., 1998). اما آلودگی با هرپس ویروس اسبی تیپ ۴ عمدتاً منجر به بیماری تنفسی در کره‌های جوان می‌شود، ولی به ندرت باعث سقط جنین و حتی بیماری عصبی و مرگ‌ومیر نوزادان نیز می‌گردد. نشانه‌های بالینی ناشی از عفونت با این ویروس شامل تب، سرفه، ریزش بینی و التهاب ملتحمه چشم می‌باشد (Pavulraj *et al*., 2021). مشابه دیگر هرپس ویروس‌ها، تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی نیز پس از آلودگی طبیعی به شکل نهفته در گانگلیون‌های عصب سه‌قلو یا لنفوسیت‌ها باقی می‌مانند و مجدداً طی استرس‌های زایمان، از شیرگیری، حمل و نقل، واکسیناسیون و استعمال کورتیکواستروئیدها، به شکل فعالی انتشار می‌یابند و بدین نحو، نقش مهمی را در بقای عفونت درون جمعیتی و شکل‌گیری همه‌گیری‌های جدید ایفا می‌کنند (Taouji *et al*., 2002; Allen *et al*., 2004; Pusterla *et al*., 2012). اسب‌سانان می‌توانند در طول زندگی خود چندین بار به عفونت‌های هرپس ویروسی بصورت بالینی مبتلا شوند، ولی هر بار از شدت بیماری کاسته می‌شود و مقاومت به آلودگی مجدد، می‌تواند پس از عفونت‌های مکرر حاصل شود (Derbal, 2021). کنترل بیماری توسط واکسیناسیون، حداقل در مورد تیپ ۱ از موفقیت زیادی برخوردار نبوده ولی در کاهش شدت و طول مدت بیماری تنفسی، کاهش موارد سقط و حتی جلوگیری از ظهور اشکال مرگبار عصبی موثر می‌باشد (Damiani *et al*., 2014; Mahmoud *et al*., 2022).

روش‌های سرولوژیک متفاوتی برای شناسایی پادتن‌های اختصاصی ضد تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی استفاده شده‌است (Studdert *et al*., 2003)، ولی بدلیل حساسیت بالا و امتیازات عملی، غالبا بصورت روتین از روش الایزا بدین منظور استفاده می‌شود (Hassanpour *et al*., 2010; Gharekhani and Morshedi, 2010; Attari and Araghi-Sooreh, 2020). در ایران هم، مطالعات سرولوژیک و ملکولی، جهت بررسی حضور سروتیپ‌های هرپس ویروس اسبی در مناطق مختلف جغرافیایی صورت گرفته (Momtaz and hemmatzadeh, 2003; Tazike *et al*.,

2019; Raoofi *et al.*, 2019) و حتی گزارشی نیز از وقوع میلوانسفالوپاتی ناشی از تیپ ۱ ویروس مذکور موجود می‌باشد (Taghipour Bazarghani *et al.*, 2014).

با توجه به گسترش روز افزون صنعت پرورش اسب در استان آذربایجان‌غربی و بویژه مرکز استان (شهرستان ارومیه) و نیز مشاهده مواردی از درگیرهای تنفسی در اسب‌های منطقه، مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی سرمی آلودگی اسب‌های باشگاهی شهرستان ارومیه به تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی و نیز بررسی نقش متغیرهای سن، جنس، نژاد در فراوانی مذکور و همچنین وجود نشانه‌های بالینی در موارد مثبت سرمی، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

طی یک مطالعه مقطعی، از بهمن ماه ۱۴۰۰ تا فروردین ۱۴۰۱ با مراجعه به باشگاه‌های سوارکاری ستارخان، پگاسوس، اسب سفید و آتا در شهرستان ارومیه، در کل از ۵۱ رأس اسب (۴۲ رأس نر و ۹ راس ماده) به‌طور تصادفی خون‌گیری به‌عمل آمد. تعداد ۳۱ رأس از اسب‌های مورد مطالعه از نژاد کرد، ۹ رأس از نژاد عرب، ۵ رأس از نژاد ترکمن و ۶ رأس هم از نژاد آمیخته بودند. همچنین میانگین سن اسب‌ها ۵/۳۰± ۱۲/۸ سال بوده و در محدوده سنی یک تا ۲۳ سال قرار داشتند. جهت بررسی اثر سن بر فراوانی سرمی پادتن‌های اختصاصی ضد تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی، اسب‌های مورد مطالعه، به ۴ گروه ۴ ساله و پایین‌تر(شامل۱۷ رأس)، ۵ تا ۸ ساله (شامل ۱۱ رأس)، ۹ تا ۱۲ساله (شامل ۱۲ رأس) و بالاتر از ۱۲ ساله (شامل ۱۱ رأس) تقسیم شدند. نمونه‌های خون از ورید وداج اسب‌ها به مقدار ۵ میلی‌لیتر توسط ونوجکت (شرکت گرینر- آلمان) اخذ شد و درون لوله‌های ژل‌دار (شرکت گرینر- آلمان) و در مجاورت یخ خشک به آزمایشگاه ایمونولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه منتقل گردید. پس از انجام سانتریفوژ (شرکت پدیده نوژن پارس- ایران) و جداسازی سرم از خون، نمونه‌های سرم درون میکروتیوب‌های استریل تا زمان آزمایش در فریزر (شرکت امرسان- ایران) در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری گردید. لازم به ذکر است که در حین خون‌گیری فقط یک رأس از اسب‌ها نشانه‌هائی از مشکل تنفسی داشت و مابقی آن‌ها، فاقد نشانه یا سابقه بیماری تنفسی، عصبی یا سقط بودند.

در تحقیق حاضر، آزمایش الایزا به روش غیرمستقیم و با استفاده از کیت تجاری (Ingezim Rinopneumonitis 14.HVE.K.1, Ingenasa) محصول کشور اسپانیا انجام شد که برای ردیابی پادتن‌های اختصاصی ضد تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس در سرم اسب طراحی شده‌است. آزمایش فوق، دارای حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی۶۷ درصد بوده و بدلیل وجود واکنش متقاطع بین EHV-1 و EHV-4 قادر به تفریق این ۲ تیپ هرپس ویروس اسبی از یکدیگر نیست. مراحل آزمایش طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام گرفت. پس از قرائت نتیجه حاصله در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر(شرکت بیوتک- آمریکا)، نتایج براساس نسبت مقدار جذب نوری سرم نمونه (OD sample) منهای مقدار جذب نوری کنترل منفی (OD negative control) به مقدار جذب نوری کنترل مثبت (OD positive control)

منهای مقدار جذب نوری کنترل منفی (OD negative control)، طبق فرمول زیر محاسبه شد و مقدار S/P% (sample to positive) مساوی یا بالاتر از ۰/۳ مثبت و کوچکتر از ۰/۳ منفی در نظر گرفته شد.

$$S/P\ \% = \frac{\text{OD 405nm Sample} - \text{OD 405nm C(-)}}{\text{OD 405nm C(+)} - \text{OD 405nm C(-)}}$$

- تحلیل آماری داده‌ها

تحلیل آماری داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ انجام شد. یافته‌های توصیفی متغیرهای مورد مطالعه، شامل شاخص‌هایی از قبیل فراوانی مطلق و نسبی محاسبه و گزارش گردید. با استفاده از جداول توافقی دوطرفه و آزمون کای‌دو پیرسون و آزمون دقیق فیشر وابستگی بین متغیرهای دموگرافیک (سن، جنس، نژاد و نشانه‌های بالینی) بررسی شد و در صورت وجود تفاوت معنی‌دار، اختلاف بین گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی بن‌فرونی مشخص گردید. جهت پیش‌بینی احتمال مشاهده موارد سرمی مثبت براساس متغیرهای دموگرافیک پیش‌بین، از آزمون رگرسیون لجستیک چند متغیره استفاده شد. لازم به ذکر است که در تمام مراحل تجزیه و تحلیل آماری، خطای مجاز برای رد فرضیه صفر (H_0)، ۵ درصد درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

از مجموع ۵۱ نمونهٔ خون اخذ شده از اسب‌های باشگاه‌های مختلف شهرستان ارومیه، تعداد ۹ نمونه (۱۷/۶۵ درصد) (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۲۸/۰-۷/۲) برای پادتن‌های اختصاصی ضد تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی، مثبت بودند و تعداد ۴۲ نمونه (۸۲/۳۵ درصد) (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۹۲/۸-۷۲/۰) هم منفی تشخیص داده‌شدند.

طبق نتایج ارائه‌شده در جدول ۱، از تعداد ۱۷ رأس اسب ۴ ساله و پایین‌تر، ۴ رأس (۲۳/۵ درصد)، از تعداد ۱۱ رأس اسب ۸-۵ ساله، ۳ رأس (۲۷/۳ درصد)، از تعداد ۱۲ راس اسب ۱۲-۹ ساله، ۱ رأس (۸/۳ درصد) و از تعداد ۱۱ رأس اسب بالای ۱۲ سال، ۱ رأس (۹/۱ درصد)، در خصوص آلودگی با تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی، از لحاظ سرمی مثبت بودند. نتایج آزمون کای دو پیرسون برای بررسی وابستگی بین دو متغیر سن اسب و فراوانی موارد سرمی مثبت فوق هم نشان داد که با وجود کاهش شیوع آلودگی با افزایش سن اسب‌ها، از ۸ سالگی به بعد، وابستگی معنی‌داری بین سن اسب‌ها و فراوانی موارد مثبت وجود ندارد ($X^2(۳)=۲/۳۷۶$ ، $p=۰/۵۹۳>۰/۰۵$).

جدول ۱- نتایج آزمون مربع کای پیرسن برای جدول متقاطع فراوانی آلودگی به هرپس ویروس اسبی و سن اسب‌ها

سن اسب	فراوانی سرمی آلودگی به هرپس ویروس اسبی		مقدار شاخص کای‌دو	درجه آزادی	ارزش p
	تعداد موارد مثبت	تعداد موارد منفی			
۴≤	۴ (۲۳/۵ درصد)	۱۳ (۷۶/۵ درصد)	۲/۳۷۶	۳	۰/۵۶۳
۸-۵	۳ (۲۷/۳ درصد)	۸ (۷۲/۷ درصد)			
۱۲-۹	۱ (۸/۳ درصد)	۱۱ (۹۱/۷ دصد)			
۱۲<	۱ (۹/۱ درصد)	۱۰ (۹۰/۹ درصد)			

همچنین طبق نتایج ارائه شده در جدول ۲، از تعداد ۴۲ رأس اسب نر، ۷ رأس (۱۶/۷ درصد) و از تعداد ۹ رأس اسب ماده، ۲ رأس (۲۲/۲ درصد)، درخصوص آلودگی با تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی، از لحاظ سرمی مثبت بودند. نتایج آزمون کای دو پیرسون و آزمون دقیق فیشر هم حاکی است که به لحاظ آماری بین جنسیت و فراوانی آلودگی به هرپس ویروس اسبی وابستگی معنی داری وجود ندارد ($X^2(1)$=۰/۱۵۷ ، p=۰/۶۵۱>۰/۰۵).

جدول ۲- نتایج آزمون مربع کای پیرسن برای جدول متقاطع فراوانی هرپس ویروس اسبی و جنسیت اسب‌ها

جنسیت اسب	فراوانی سرمی آلودگی به هرپس ویروس اسبی		مقدار شاخص کای‌دو	درجه آزادی	ارزش p
	تعداد موارد مثبت	تعداد موارد منفی			
نر	۷ (۱۶/۷ درصد)	۳۵ (۸۳/۳ درصد)	۰/۱۵۷	۱	۰/۶۵۱
ماده	۲ (۲۲/۲ درصد)	۷ (۷۷/۸ درصد)			

از طرف دیگر، طبق نتایج ارائه شده در جدول ۳، از تعداد ۳۱ رأس اسب کرد، ۶ رأس (۱۹/۴ درصد)، از تعداد ۹ رأس اسب عرب، ۲ رأس (۲۲/۲ درصد) و از تعداد ۶ رأس اسب آمیخته، ۱ رأس (۱۶/۷ درصد)، درخصوص آلودگی با تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی، از لحاظ سرمی مثبت بودند و هیچ‌کدام از ۵ رأس اسب ترکمن، واکنش مثبت سرمی نشان ندادند. داده‌های خروجی آزمون کای دو پیرسون و آزمون دقیق فیشر هم نشان داد که وابستگی معنی‌داری بین نژاد اسب‌ها و فراوانی موارد سرمی مثبت فوق، وجود ندارد ($X^2(3)$=۱/۲۶۷ ، p=۰/۸۷۴>۰/۰۵).

جدول ۳- نتایج آزمون مربع کای پیرسن برای جدول متقاطع فراوانی آلودگی به هرپس ویروس اسبی و نژاد اسب‌ها

نژاد اسب	فراوانی سرمی آلودگی به هرپس ویروس اسبی		مقدار شاخص کای‌دو	درجه آزادی	ارزش p
	تعداد موارد مثبت	تعداد موارد منفی			
کرد	۶ (۱۹/۴ درصد)	۲۵ (۸۰/۶ درصد)	۱/۲۶۷	۳	۰/۸۷۴
عرب	۲ (۲۲/۲ درصد)	۷ (۷۷/۸ درصد)			
ترکمن	۰ (۰/۰ درصد)	۵ (۱۰۰/۰ درصد)			
آمیخته	۱ (۱۶/۷ درصد)	۵ (۸۳/۳ درصد)			

همچنین طبق نتایج ارائه‌شده در جدول ۴، از تعداد ۵۰ رأس اسب بدون نشانه یا سابقه بیماری یا سقط، تعداد ۹ رأس آن‌ها (۱۸ درصد)، درخصوص آلودگی با تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی، از لحاظ سرمی مثبت بودند. لیکن در ۱ رأس اسب با نشانه‌های بالینی، واکنش مثبت سرمی فوق، دیده نشد. نتایج آزمون کای دو پیرسون و آزمون دقیق فیشر هم حاکی است که به لحاظ آماری وابستگی بین وجود نشانه‌های بالینی در اسب‌های مورد آزمایش و موارد مثبت سرمی وجود ندارد ($X^2(1)$=۰/۲۱۹ ،p=۰/۸۲۴>۰/۰۵).

جدول ۴- نتایج آزمون مربع کای پیرسن برای جدول متقاطع فراوانی آلودگی به هرپس ویروس اسبی و نشانه‌های بالینی در اسب‌ها

وضعیت نشانه‌های بالینی در اسب	فراوانی سرمی آلودگی به هرپس ویروس اسبی		مقدار شاخص کای‌دو	درجه آزادی	ارزش p
	تعداد موارد مثبت	تعداد موارد منفی			
واجد نشانه	۹ (۱۸/۰ درصد)	۴۱ (۸۲/۰ درصد)	۰/۲۱۹	۱	۰/۸۲۴
فاقد نشانه	۰ (۰/۰ درصد)	۱ (۱۰۰/۰ درصد)			

به‌طور کلی براساس یافته‌های تحقیق حاضر مشخص شد، مدل رگرسیون لجستیک چند متغیره در بررسی تاثیر سن، جنس و نژاد در اسب‌های مورد مطالعه به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۵۲۹>۰/۰۵، $X^2(3)$=۲/۲۱۶) و مدل از برازش لازم برخوردار بود. مدل (Nagelkerke R^2)، ۷/۰ درصد از واریانس را در آلودگی با ویروس توضیح داده و ۸۲/۴ درصد از موارد را بطور صحیحی طبقه‌بندی کرد و از میان سه متغیر پیش‌بینی کننده سن، جنس و نژاد، هیچ‌کدام تاثیر معنی‌داری نداشتند. همچنین رگرسیون لجستیک چند متغیره نشان داد که در اسب‌های باشگاهی شهرستان ارومیه شانس آلودگی بین سن برحسب سال و آلودگی به هرپس ویروس اسبی، ۱/۵۰۸ (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۳/۱۱۵ – ۰/۷۸۷) است (p=۰/۲۰۲>۰/۰۵) و سن اسب‌های شهرستان ارومیه، ۰/۴۴۹ درصد از تغییرات آلودگی را توجیه می‌کند. به بیان دیگر با کاهش ۴ سال از سن اسب‌ها، احتمال بروز آلودگی نیز حدود ۱/۵۱ برابر افزایش می‌یابد. از طرف دیگر رگرسیون لجستیک نشان داد که شانس آلودگی اسب‌های ماده ۱/۵۴۹ برابر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۹/۵۲۹–۰/۲۵۲) اسب‌های نر است (p=۰/۶۳۷>۰/۰۵) و جنسیت ۰/۴۳۷ درصد از تغییرات آلودگی را توجیه می‌کند. همچنین نتایج رگرسیون لجستیک حاکی از آن است که نوع نژاد اسب‌ها، ۰/۲۱۷ درصد از تغییرات آلودگی به هرپس ویروس اسبی را توجیه می‌کند و شانس آلودگی اسب‌های نژاد عرب ۱/۶۱۹ برابر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۱۱/۳۸۷–۰/۲۳۰) اسب‌های کرد (p=۰/۷۸۲>۰/۰۵) و۱/۱۳۵ برابر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۱۷/۵۳–۰/۰۷۴) اسب‌های ترکمن می‌باشد (p=۰/۹۲۸>۰/۰۵). همچنین شانس آلودگی اسب‌های آمیخته ۱/۴۲۶ برابر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۱۷/۵۴۳–۰/۱۱۶) اسب‌های ترکمن می‌باشد (p=۰/۷۸۲>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر که برای اولین بار در استان آذربایجان‌غربی انجام گرفته و دومین مطالعه سرولوژیک در ایران است، فراوانی آلودگی به هردو تیپ ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی در شهرستان ارومیه، ۱۷/۶۵ درصد تعیین گردید، اما به‌دلیل عدم توانایی کیت استفاده شده در تفریق سروتیپ‌های تحت بررسی و فقدان مطالعات سرواپیدمیولوژیک کافی در ایران، امکان مقایسه نتایج و تفسیر دقیق یافته‌ها وجود ندارد. البته درتنها مطالعه دردسترس به روش الایزا درایران، ۶۸/۹۶ درصد اسب‌ها برای تیپ ۴ و ۳۹/۰۸ درصد اسب‌ها برای تیپ ۱ و همین مقدار برای هر ۲ تیپ، در استان چهارمحال

بختیاری واکنش مثبت سرمی را نشان دادند (Momtaz and Hemmatzadeh, 2003).

در مطالعات سرولوژیک انجام گرفته به روش الایزا در دیگر کشورها از جمله کلمبیا (Ruiz-Saenz *et al.*, 2008)، مصر (Amer *et al.*, 2011)، اتیوپی (Getachew *et al.*, 2014)، ترکیه (Yildirim *et al.*, 2015)، قرقیزستان (Avci *et al.*, 2018) و مراکش (El Brini *et al.*, 2021) نیز نتایج مشابه بدست آمده است، گرچه در بررسی که در اسپانیا به روش خنثی‌سازی سرم انجام شده است پادتن‌های تیپ۱ از غالبیت برخوردار بودند (Cruz *et al.*, 2016). البته باید خاطرنشان شد که بر خلاف تست الایزا، روش خنثی‌سازی سرم ممکن است واکنش‌های متقاطع بین ۲ سروتیپ نشان دهد (Hartley *et al.*, 2005). باید توجه کرد که در این میان به نظر می‌رسد، اهمیت تیپ ۴ هرپس ویروس اسبی در آلودگی اسب‌های ایران بیشتر است و علاوه بر مطالعه سرولوژیک انجام گرفته، مطالعات ملکولی نیز مؤید آن می‌باشد. به‌طوری‌که نتایج حاصله از PCR نمونه‌های خون اخذ شده در شمال شرق ایران و خوزستان نشان داده که همه نمونه‌ها از نظر وجود هرپس ویروس اسبی تیپ ۱ منفی بودند در حالی‌که ۵۶/۱۶ تا ۷۴/۵ درصد از نمونه‌های خون واجد DNA هرپس ویروس اسبی تیپ ۴ بوده‌اند (Sarani *et al.*, 2013; Ghadrdan Mashhadi *et al.*, 2018). در بررسی ملکولی انجام شده بر روی اسب‌های واجد نشانه یا سابقه بیماری نیز گزارش شده که بیشتر درگیری‌ها با تیپ ۴ هرپس ویروس اسبی بوده‌است (Tazike *et al.*, 2019; Raoofi *et al.*, 2019). لذا به نظر می‌رسد که همانند اکثر کشورها در ایران نیز فراوانی آلودگی با هرپس ویروس اسبی تیپ ۱ به‌مراتب کمتر می‌باشد، اما نباید از احتمال وقوع همه‌گیری‌های ناشی از تیپ ۱ در ایران غافل شد (Taghipour Bazarghani *et al.*, 2014). البته تفاوت‌هایی که در میزان آلودگی به هرپس ویروس اسبی مابین کشورهای مختلف وجود دارد، می‌تواند ناشی از تفاوت‌های آب و هوایی، فصل نمونه‌گیری، مدیریت، جمعیت اسبی، وضعیت ایمنی، نقل و انتقال اسب‌ها و حضور دیگر بیماری‌ها باشد (Ataseven *et al.*, 2009). همچنین باید توجه کرد که ویروس مذکور در شرایط معتدل تا سرد زنده‌مانی بیشتری دارد و این امر شانس آلودگی را افزایش می‌دهد (Matsumura *et al.*, 1992). از طرفی استرس‌های سرمایی در فعالیت مجدد اشکال نهفته بیماری و انتشار بیماری موثر است (Welch *et al.*, 1992). ازدحام، مخصوصا در فصول سرد سال و تماس نزدیک اسب‌ها در رده‌های سنی مختلف و انتقال ویروس حتی توسط دامپزشکان نیز در افزایش میزان آلودگی باید مدنظر قرارگیرد (Glass and Barness, 2013).

از طرف دیگر در تحقیق حاضر هیچ یک از متغییرهای چهارگانه سن، جنس، نژاد و نشانه‌های بالینی، تاثیر معنی‌داری بر فراوانی موارد مثبت سرمی آلودگی به هرپس ویروس اسبی نداشتند (جداول ۱ تا ۴) که احتمالاً این امر می‌تواند ناشی از حجم کم نمونه و توزیع غیر نرمال متغیرها مخصوصاً جنسیت اسب‌های بررسی شده‌باشد. در این ارتباط وضعیت مشابه در مطالعه قدردان مشهدی و همکاران نیز دیده شده‌است (Ghadrdan Mashhadi *et al.*, 2018)، اما در هلند، امریکای شمالی و اسپانیا، میزان آلودگی به EHV-1/EHV-4 با افزایش سن، بطور معنی‌داری بیشتر بوده

است (Goehring *et al.*, 2006; Henninger *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2016)، نتایج مشابهی در مطالعه ممتاز و همت زاده و نیز تک‌تاز حفشه‌جانی و همکاران نیز گزارش شده‌است (Momtaz and Hemmatzadeh, 2003; Taktaz Hafshejani *et al.*, 2015).

از طرف دیگر بایستی توجه کرد، در آن‌دسته از بیماری‌های عفونی که باعث مرگ و میر نمی‌شوند، به موازات افزایش سن دام، بدلیل افزایش احتمال مواجهه با جرم بیماری‌زا، احتمال آلودگی نیز بیشتر می‌شود، به‌طوری‌که نقل و انتقال اسب‌های بزرگسال بدلیل شرکت در مسابقات و یا فروش، شانس آلوده‌شدن آن‌ها را افزایش می‌دهد. البته در مطالعه حاضر بطور غیرمعنی‌داری آلودگی به هرپس ویروس اسبی در سنین پائین‌تر بیشتر بود (جدول ۱)، که این موضوع می‌تواند ناشی از تبدیل شدن عفونت به شکل نهفته در سنین بالا و ایزولاسیون اسب‌های باشگاهی بزرگسال در ارومیه باشد.

در خصوص تاثیر جنسیت، در مطالعه حاضر شاهد آلودگی بیشتر اسب‌های ماده بودیم که البته اختلاف مذکور معنی‌دار نبود (جدول ۲). در تحقیق ممتاز و همت زاده نیز میزان آلودگی با تیپ ۱ در جنس ماده بطور معنی‌داری بیشتر بوده و گزارش شده این امر ناشی از مشارکت بیشتر ویروس در سندرم تناسلی و سقط جنین می‌باشد (Momtaz and Hemmatzadeh, 2003)، از طرفی هم مادیان‌ها به‌عنوان مخزن برای تیپ ۱ هرپس ویروس اسبی مطرح هستند (Gilkerson *et al.*, 1999). نتیجه مشابهی هم در تحقیق انجام گرفته در هلند بدست آمده‌است (Goehring *et al.*, 2006). اما در مطالعه انجام یافته در اصفهان و شهرکرد، میزان آلودگی نریان‌ها بیشتر گزارش گردیده که این امر می‌تواند مربوط به فعالیت‌های تولید مثلی و ملاقات مادیان‌های مختلف و یا شرکت بیشتر در مسابقات باشد (Taktaz Hafshejani *et al.*, 2015).

گزارشاتی هم از حساسیت نژادی در آلودگی به هرپس ویروس اسبی وجود دارد (Goehring *et al.*, 2006). در این ارتباط مورد مشترک در مطالعه حاضر با یافته‌های تحقیق انجام گرفته در اصفهان و شهرکرد، عدم آلودگی اسب‌های ترکمن بود (Taktaz Hafshejani *et al.*, 2015) که در این خصوص به نظر می‌رسد تفاوت در کارآیی سیستم ایمنی در این امر دخیل بوده‌است.

نتیجه‌نهائی تحقیق حاضر این‌که، نظر به عدم واکسیناسیون اسب‌های تحت مطالعه، می‌توان نتیجه غربالگری حاضر را مواجهه طبیعی نسبتا بالایی با تیپ‌های ۱ و ۴ هرپس ویروس اسبی در جمعیت اسب‌های باشگاهی شهرستان ارومیه دانست. به نظر می‌رسد بدلیل عدم توانایی شناسایی حاملین در تحقیق حاضر، میزان آلودگی واقعی به هرپس ویروس اسبی در باشگاه‌های سوارکاری شهرستان ارومیه، بیشتر از رقم گزارش شده باشد که این مهم می‌تواند لزوم توجه مسئولان ذیربط به اهمیت کنترل و پیشگری آلودگی با سروتیپ‌های مطالعه شده و اتخاذ استراتژی‌های مدیریتی مناسب و بهره‌وری از واکسیناسیون جهت جلوگیری و یا حداقل، کاهش خسارات اقتصادی صنعت پرورش اسب را گوشزد کند. همچنین افزایش سطح آگاهی پرورش‌دهندگان اسب و بکار بردن سیستم‌های امنیت زیستی، از جمله جداسازی مادیان‌های آبستن از دیگر اسب‌ها نیز در کاهش موارد

سقط موثر خواهد بود. از طرف دیگر با توجه به این نکتهٔ مهم که منشا آلودگی در بسیاری از گله‌های آلوده می‌تواند اسب‌های مبتلا به اشکال نهفته بیماری باشد که در بیشتر موارد هم، پاسخ منفی به آزمایشات سرولوژیک می‌دهند، توصیه می‌شود جهت مشخص شدن چهره واقعی اپیدمیولوژی آلودگی با تیپ‌های ۱و ۴ هرپس‌ویروس اسبی، به‌طور همزمان از آزمایشات ردیابی‌کننده پادگنی و ملکولی (انجام آزمایشات موازی) در طیف وسیعی از جمعیت تک‌سمیان شهرستان ارومیه و استان آذربایجان‌غربی استفاده شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از مسئولین محترم آزمایشگاه ایمونولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه بخصوص جناب آقای مهندس جعفری و نیز صاحبان شریف باشگاه‌های سوارکاری شهرستان ارومیه بخاطر همکاری در اجرای تحقیق حاضر قدردانی می‌نماید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع وجود ندارد.

منابع

- Allen, G.P., Kydd, J.H., Slater, J.D. and Smith, K.C. (2004). Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In: Coetzer, JAW and Tustin, RC (Eds.), Infectious diseases of livestock. 2nd ed., Chapter 76, Cape Town, Oxford Press, pp: 829-859.
- Amer, H.M., Shaltout, A.K., El-Sabagh, I.M., El-Sanousi, A.A. and Shalaby, M.A. (2011). Prevalence of equine herpes viruses 1, 2 and 4 in Arabian horse population in Egypt. African Journal of Microbiology Research, 5(27):4805-4811.
- Attari, A. and Araghi-Sooreh, A. (2022). Serological survey of influenza A virus infection in horses of some districts of Mahabad city by ELISA method. Veterinary Clinical Pathology, 15(4): 357-367.[In Persian]
- Ataseven, V., Dagalp, S., Guzel, M., Basaran, Z., Tan, M. and Geraghiy, 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., Yapici, O., Bulut, O., Kale, M. and Atli, K. (2018). Detection of equine herpes virus 1, equine herpes virus 4, and equine arteritis virus antibodies in Kyrgizstan by ELISA. Bionature, 38(3):219-224.
- Burgess, B.A., Tokateloff, N., Manning, S., Lohmann, K., Lunn, D.P., Hussey, S.B., *et al*. (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.
- Cruz, F., Fores, P., Mughini-Gras, L., Ireland, J., Moreno, M.A. and Newton, J.R. (2016). Seroprevalence and factors associated with equine herpesvirus type 1 and 4 in Spanish Purebred horses in Spain. Veterinary Record, 178(16): 398-398.
- Derbal, S. (2021). Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 infections: A review. International Journal of Veterinary Sciences, 7(2): 108-112.
- Damiani, A.M., Vries, M., Reimers, G., Winkler, S. and Osterrieder, N. (2014). A severe equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion outbreak caused by a neuropathogenic strain at a breeding farm in northern Germany. Veterinary Microbiology, 172(3-4): 555-562.

- El Brini, Z., Fassi Fihri, O., Paillot, R., Lotfi, C., Amraoui, F. and El Ouadi, H. (2021). Seroprevalence of equine herpesvirus 1 (EHV-1) and equine herpesvirus 4 (EHV-4) in the northern Moroccan horse populations. Animals, 11(10): 2851.
- Getachew, M., Alemayehu, F., Chala, C., Amare, B., Kassa, D., Burden, F., *et al*. (2014). A cross-sectional sero-survey of some infectious diseases of working equids in Central Ethiopia. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health, 6(9): 231-238.
- Gharekhani, A. and Morshedi, A. (2010). The study of infection rate to Bovine Herpes Virus–1 (BHV-1) in milk samples of dairy cattle in Urmia and Maku by ELISA method. Veterinary Clinical Pathology, 4(3): 915-921.[In Persian]
- Gilkerson, J. R., Whalley, J. M., Drummer, H. E., Studdert, M. J. and Love, D. N. (1999) Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. Veterinary Microbiology, 68(1-2): 15-25.
- Goehring, L.S., Van Winden, S.C., Van Maanen, C. and Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.C. (2006). Equine herpesvirus type1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: a four year retrospective study (1999–2003). Journal of Veterinary Internal Medicine, 20(3): 601-607.
- Ghadrdan Mashhadi, A.R., Makvandi, R., Hadi Nasab, H. and Deifiabad Shapouri, M.R. (2018). Study of infection rate of Herpes virus type 1, 4 in horses of Khuzestan. International Congress of Equine Health and Horse Industry, Iran. pp: 20-28.
- Glass, K. and Barnes, B. (2013). Eliminating infectious diseases of livestock: a metapopulation model of infection control. Theoretical Population Biology, 85(1): 63-72.
- Hassanpour, A., Rezaei Saber, A.P. and Mosakhani, F. (2010). Serologic investigation of the prevalence of Equine infectious anemia virus in Tabriz area. Veterinary Clinical Pathology, 4(2): 837-841.[In Persian]
- Henninger, R.W., Reed, S.M. and Saville, W.J. (2007). Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. Journal of Veterinary Internal Medicine, 21(1): 157-165.
- Harless, W. and Pusterla, N. (2006). Equine herpesvirus 1 and 4 respiratory disease in the horse. Clinical Techniques in Equine Practice, 5(3): 197-202.
- Hartly, C.A., Wilks, C.R., Studdert, M.J. and Gilkerson, J.R. (2005). Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpes virus1 and 4 infections in horses. American Journal of Veterinary Research, 66(5): 921-928.
- Momtaz H. and Hemmatzadeh F, (2003). A Serological survey on equine herpes virus 1 and equine herpes virus 4 in the horse using ELISA. Pajouhesh and Sazandegi, 16(259): 63-69. [In Persian]
- Mahmoud, H.Y.A.H., Fouad, S.S. and Amin, Y.A. (2022). Review of two viral agents of economic importance to the equine industry (equine herpesvirus-1 and equine arteritis virus). Equine Veterinary Education, 35(2): 92-101.
- Matsumura, T., Sugiura, T., Imagawa, H., Fukonaga, Y. and 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.
- Pusterla, N., Barnum, S., Miller, J., Varnell, S., Dallap-Schaer, B., Aceto, H. *et al*. (2021). Investigation of an EHV-1 outbreak in the United States caused by a new H752 genotype. Pathogens, 10(6): 747-756.
- Pusterla, N., Mapes, S., Wademan, C., White, A., Estell, K. and Swain, E. (2012). Investigation of the role of mules as silent shedders of EHV-1 during an outbreak of EHV-1 myeloencephalopathy in California. Veterinary Record, 170(18): 465-465.
- Pavulraj, S., Eschke, K., Theisen, J., Westhoff, S., Reimers, G., Andreotti S., *et al*. (2021). Equine herpesvirus type 4 (EHV-4) outbreak in Germany: virological, serological and molecular investigations. Pathogens, 10(7): 810-832.

- Raoofi, A., Madadgar, O., Akbarein, H. and Tazikeh, A. (2019). 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 Medicine, 14(1): 27-36. [In Persian]
- Ruiz-Saenz, J., Goez, Y., Urcuqui-Inchima, S., Gongora, A. and Lopez-Herrera, A. (2008). Serological evidence of the infection by equine herpesvirus type 1 and 4 in two regions in Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 21(2): 251-258.
- Sarani, A., Mohammadi, G., Mayameei, A. and Akbari, M. (2013). Investigation of equine herpesvirus-1 and 4 infections in equine population of Iran by real-time PCR. Human and Veterinary Medicine, 5(1): 29-33.
- Slater, J., Equine herpesviruses. In: Sellon, D. and Long, M. (2007). Equine Infectious Diseases. Chapter 13, St. Louis, USA, Saunders Elsevier, pp: 134-153.
- Studdert, M. J., Hartley, C. A., Dynon, K., Sandy, J. R., Slocombe, R. F., Charles, J. A., *et al*. (2003). Outbreak of equine herpes virus type 1 myeloencephalitis: New insights from virus identification by PCR and the application of an EHV-1-specific antibody detection ELISA. Veterinary Record, 153(14): 417-423.
- Sutton. G., Garvey, M., Cullinane, A., Jourdan, M., Fortier, C., Moreau, P. *et al*. (2019). Molecular surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion. Viruses, 11(10): 916-927.
- Taghipour Bazargani, T., Momtaz, H., Baharlo, F.R. and Ghafari, M. (2014). The first report on myloencephalopathy caused by equine herpes virus type 1 in Iran. Iranian Veterinary Journal. 10(3): 100-103. [In Persian]
- Taouji, S., Collobert, C., Gicquel, B., Sailleau, C., Brisseau, N., Moussu, C. *et al*. (2002). Detection and isolation of equine herpes viruses 1 and 4 from horses in Normandy: an autopsy study of tissue distribution in relation to vaccination status. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 49(8): 394-399.
- Tazikeh, A., Raoofi, A., Madadgar, O., Akbarein, H. and Ghadrdan-Mashhadi, A. (2019). A survey of equine herpes virus 4 infection in four provinces of Iran using Real Time PCR Taqman assay. Journal of Veterinary Research, 73(4): 483-490. [In Persian]
- Traub-Dargatz, J.L., Pelzel-McCluskey, A.M., Creekmore, L.H., Geiser-Novotny, S., Kasari, T.R., Wiedenheft, A.M., *et al*. (2013). Case-control study of a multistate equine herpesvirus myeloencephalopathy outbreak. Journal of Veterinary Internal Medicine, 27(2): 339-346.
- Taktaz Hafshejania I, T., Nekoei, Sh., Vazirian, B., Doosti, A., Khamesipour, F. and Umunna Anyanwu, M. (2015). Molecular detection of equine herpesvirus types 1 and 4 infection in healthy horses in Isfahan central and Shahrekord southwest regions, Iran. BioMedical Research International: 7page.
- Walker, C., Perotti, V.M., Love, D.N. and Whalley, I.M. (1999). Infection with equine herpesvirus 1 (EHV-1) strain HVS25A in pregnant mice. Journal of Comparative Pathology, 120(1): 15-27.
- Welch, H. M., Bridges, C. G., Lyon, A. M., Griffiths, L. and 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.
- Yildirim, Y., Yilmaz, V. and Kirmizigul, A.H. (2015). Equine herpes virus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in horses and donkeys in northeastern Turkey. Iranian Journal of Veterinary Research, 16(4): 341-344.