

## مقایسه ناحیه 1D (VP1) ژنوم ویروس تب برفکی تیپ A جدا شده از استان خراسان رضوی با ویروس های جدا شده از سایر استان ها و کشورهای همسایه

سعید زیبائی<sup>۱\*</sup> هادی کیوانفر<sup>۲</sup> محمد ربانی<sup>۲</sup> فرید همت زاده<sup>۲</sup> مهدی کیانی زاده<sup>۱</sup> محسن فتحی نجفی<sup>۱</sup> مجید فرهودی<sup>۱</sup> محمد همتی<sup>۱</sup>

(۱) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه مشهد، مشهد-ایران.

(۲) دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۱۴ اردیبهشت ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۱۸ شهریور ماه ۱۳۸۸)

### چکیده

تب برفکی یکی از مهم ترین بیماری های ویروسی دام است. تیپ های A، O و Asia1 ویروس تب برفکی از دیر باز در ایران بومی می باشند. در این مطالعه نمونه های گرفته شده (۱۰۳ نمونه طی سه سال) از دام های مشکوک، توسط آزمایش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. ۷۰۲ نوکلئوتید ناحیه 1D تا 2B ژنوم ویروس تب برفکی تیپ A جدا شده از استان خراسان رضوی تعیین توالی گردید و با سایر ویروس های ایران و منطقه مقایسه شد. در نتایج بدست آمده معلوم گردید که ویروس تیپ A جدا شده ۸۹ درصد مشابهت با ویروس های ایران و کشورهای همسایه دارد. به علاوه این ویروس با ۹۲ درصد، بیشترین تشابه را با A/IRN/1/87 (Samuel) نشان داد. بررسی فیلوژنتیک ویروس معلوم نمود که این ویروس به ویروس های A22/Iraq/92 و A/IRN/iso105 نزدیک بوده و با آنها در یک Lineage قرار می گیرد. اطلاعات نشان می دهد که ویروس تب برفکی تیپ A جدا شده از استان خراسان رضوی مشابهت زیادی با A/IRN/87v ویروس واکسن ایران دارد و واکسن قادر است آنتی بادی محافظت کننده بر علیه آن ایجاد نماید.

واژه های کلیدی: ویروس تب برفکی، تیپ A، استان خراسان رضوی.

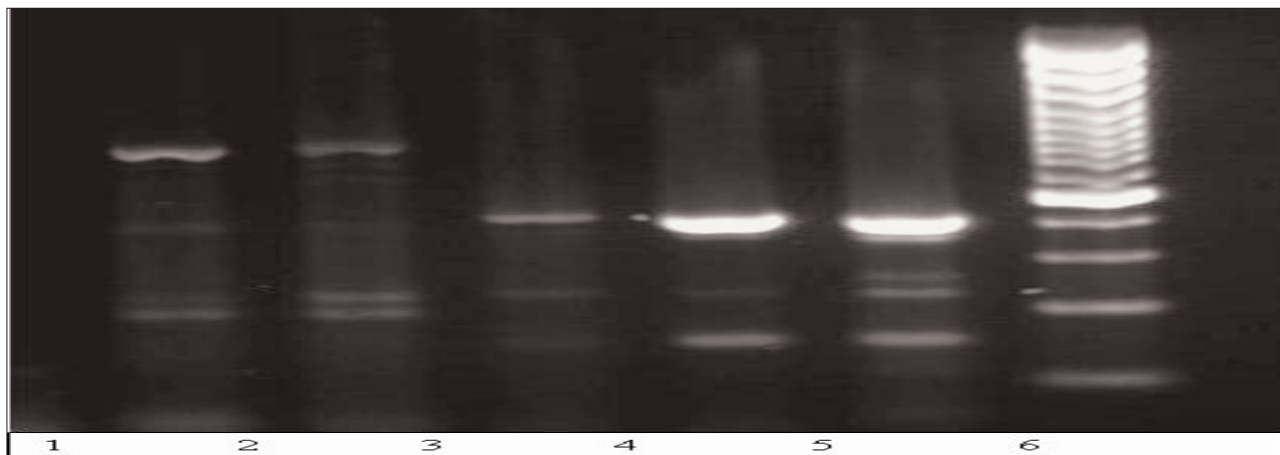
### مواد و روش کار

- ۱- نمونه گیری و آماده سازی نمونه: در این بررسی تعداد ۱۰۳ نمونه از دام های مشکوک به بیماری تب برفکی طی سه سال (از بهار ۱۳۸۳ لغایت اول تابستان ۱۳۸۶) گرفته شد. ضایعات لثه و زبان دام های مشکوک به بیماری تب برفکی اخذ و داخل بافر فسفات حاوی ۵۰ درصد گلیسرول به آزمایشگاه ارسال شد و سپس سوسپانسیون ده درصد از نمونه ها با استفاده از آب مقطر فاقد RNase تهیه گردید (۷،۹).
- ۲- استخراج RNA: جهت استخراج از کیت استخراج RNA (3) (Tripur, Roche-version) بر مبنای روش کومنزنسکی و ساچی استفاده گردید (۸،۹).
- ۳- رونوشت برداری معکوس: بر اساس روش Vangrypserrwe و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام گرفت (۸).
- ۴- واکنش PCR نیز بر اساس روش Vangrypserrwe و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام گرفت (۸).
- ۵- شناسایی محصول PCR جهت ارزیابی در ژل آگارز دو درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.
- ۶- خالص سازی و تعیین توالی اسید نوکلئیک: جهت آماده سازی محصول PCR برای تعیین توالی از کیت خالص سازی محصولات PCR طبق دستورالعمل کیت purification Kit (Roche/Germany) High pure PCR product، محصول PCR خالص و تعیین توالی نوکلئوتیدی توسط شرکت Microsynth - کشور سوئیس انجام گرفت.

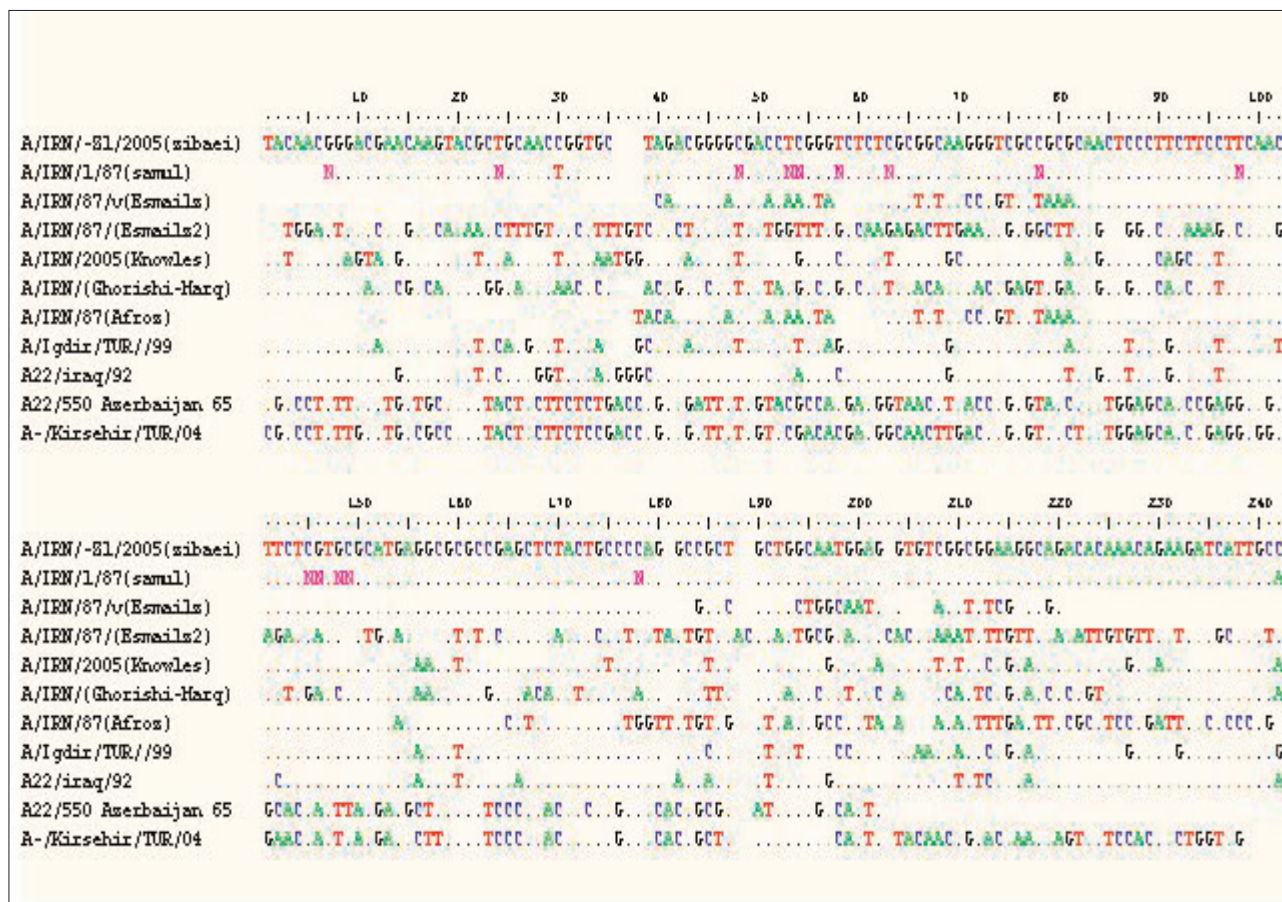
### مقدمه

تب برفکی یکی از مهم ترین بیماری ویروسی دام است، این بیماری بشدت واگیر دار بوده و تمامی زوج سمان را درگیر می نماید. عامل بیماری تب برفکی ویروسی RNA دار از خانواده پیکورناویریده و از جنس آفتوویروس است که هفت سر تیپ (SAT3-SAT2-SAT1-Asia1-C-A-O) و تعداد زیادی تحت تیپ دارد (۸،۹). تیپ A ویروس تب برفکی از نظر آنتی ژنیک متغیرترین سرو تیپ اروپائی - آسیایی و یکی از ویروس های در گردش مهم در خاور میانه است که در ایران نیز وجود دارد. ناحیه ژنومی ID مسئول صدور رمز برای تولید مهم ترین پروتئین آنتی ژن سطحی ویروس (VP1) می باشد. با مطالعه فعالیت مناطقی از VP1 و نیز تعیین توالی این منطقه در سرو تیپ های مختلف FMDV معلوم شد که بیشترین تغییرات آنتی ژنیک مربوط به مناطقی از ژنوم ویروس است که اسید آمینه های ۱۴۱ تا ۱۶۰ را رمز دهی می نمایند. اسید آمینه های این منطقه تولید آنتی بادی محافظت کننده می نمایند. منطقه دیگر متغییر Vp1 اسید آمینه های ۲۰۰-۲۱۳ در انتهای C می باشد (۳،۷) هدف از این مطالعه مقایسه ناحیه 1D (VP1) ژنوم ویروس تب برفکی تیپ A جدا شده از استان خراسان رضوی با ویروس های جدا شده از ایران و کشورهای همسایه است که سکانس ناحیه ID آنها در بانک ژن NCBI موجود می باشد.





تصویر ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR با استفاده از زل آگارز دو درصد.



تصویر ۲- مقایسه ۲۵۰ نوکلئوتید از ناحیه انتهای ID ژنوم ویروس تب برفکی تیپ A جدا از استان خراسان رضوی با تیپ های A ایران و کشورهای همسایه.

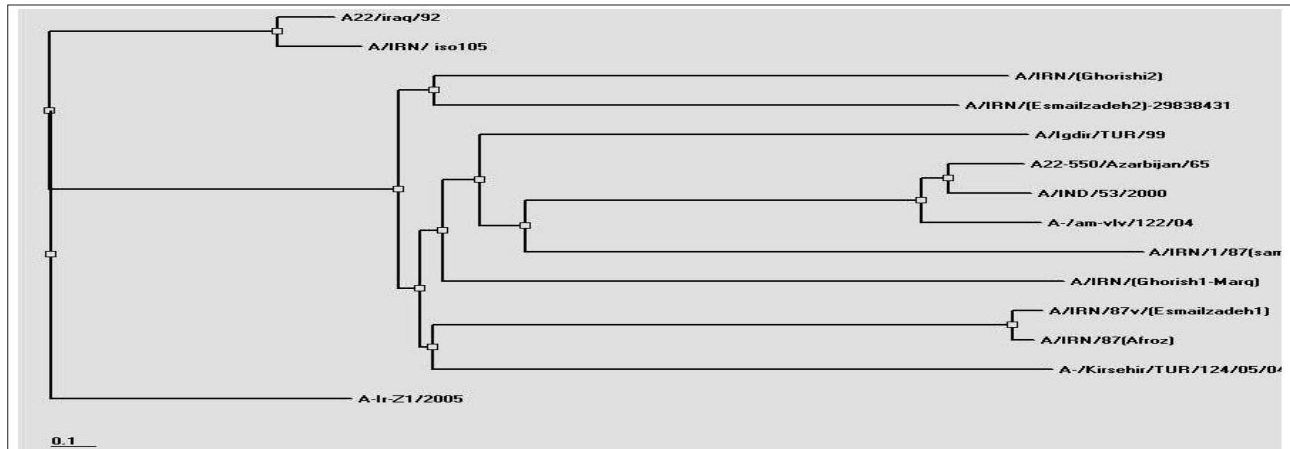
۷- بررسی مولکولی: در این تحقیق پس از شناسائی و تعیین تیپ ویروس تب برفکی توسط RT-PCR تعیین توالی نوکلئوتیدی ویروس تیپ A جدا شده از استان با ویروس های جدا شده از منطقه در ناحیه مورد نظر (ID) مقایسه گردید. سپس با استفاده از نرم افزار BioEdit میزان تشابه نوکلئوتیدی این ویروس ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آنگاه دندرোগرام

فیلوژنیک ویروس های تب برفکی تیپ A جدا شده همراه با مقایسه آنها با سایر ویروس های تب برفکی تیپ A منطقه رسم شد.

### نتایج

در این بررسی تنها دو نمونه از نمونه های مورد بررسی ویروس تب





تصویر ۳- نمودار فیلوژنتیک ویروس تب برفکی تیپ A جدا شده از استان خراسان رضوی و مقایسه آن با سایر ویروس های تب برفکی تیپ A منطقه.

به دلیل این که قدرت بهره جویی از مکانیسم اصلاح اشتباه در حین نسخه برداری و تکثیر ژنومی را ندارند دچار موتاسیون های زیاد می گردند (۷،۹). نتایج این بررسی با فرض تغییرات بیشتر اسید نوکلئیک تیپ A در منطقه ژنی 1D به نسبت سایر تیپ ها کاملاً هم خوانی دارد. اسیدهای آمینه منطقه VP1 ویروس جدا شده دچار تغییرات زیاد در اسیدهای آمینه ۱۳۵ تا ۱۵۷ پروتئین VP1 می باشد. لوپ G-H که بیشترین آنتی بادی خنثی کننده بر علیه آن تولید می شود در این ناحیه قرار دارد (۱،۷). طی سال های ۸۷-۱۹۸۶ ویروس تب برفکی تیپ A از اپیدمی های عربستان سعودی و ایران جدا شدند. ویروس هایی که جدا شده بودند از لحاظ آنتی ژنیک با سرو تیپ A22 (A22/Iraq/64) فرق داشتند. سکانس مستقیم ناحیه VP1 این ویروس ها نشان داد که حداقل دو واریانت متفاوت FMD تیپ A با هم دیگر در خاورمیانه در حال گردش هستند. که هر دوی این ها با ویروس کلاسیک A22 تفاوت دارند (۵،۶). در کشور ما تغییرات آنتی ژنیک و پیدایش تحت تیپ های جدید ویروس A در سال های اخیر نسبت به سال های گذشته شدت بیشتری پیدا نموده است به طوری که در یک دهه گذشته حداقل چهار تحت تیپ A تب برفکی (که با سوش های شناخته شده و مورد استفاده در واکنس متمایز و از نظر میزان تغییرات آنتی ژنتیکی قابل ملاحظه در حد یک تحت تیپ بوده است) جدید به ثبت رسیده است (۴،۹). Kitching و همکاران بیان می دارند که، ایران و عراق در خاورمیانه بیشترین شیوع FMD را دارند و این شیوع در ایران به خاطر واریانت هایی از ویروس A اتفاق می افتد که توسط سویه واکنس قابل کنترل نیست و منبع آن نامعلوم است (۲). اما به نظر نمی رسد که ویروس A جدا شده در استان واریانی از تیپ A باشد که واکنس نتواند آن را تحت پوشش قرار دهد. این امر در مورد شیوع تیپ A جدید ایران 05 A/IRN/ (۴). با توجه به مرزی بودن استان خراسان رضوی و با نظر به بروز واریانت های جدید تب برفکی در شرق دورو نیز با نگاه به موقعیت تب برفکی در اروپا، اهمیت این استان برای انتقال این بیماری

برفکی تیپ A تشخیص داده شد که در یک نمونه موفقیت جهت تزاید محصول PCR جهت تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک در ناحیه 1D حاصل گردید (تصویر ۱). در ارزیابی محصول PCR باند مورد انتظار ۷۳۲ مشاهده گردید که با توجه به پرایمرهای مورد استفاده تأیید می گردد که سوش مورد نظر ویروس تب برفکی تیپ A می باشد.

در این مقایسه معلوم شد که بیشترین تشابه اسیدهای نوکلئیک بین ویروس جدا شده از استان خراسان رضوی و A/IRN/1/87 (Samuel) (حدوداً ۹۲ درصد) وجود و کمترین تشابه با ویروس دیگری از ایران A/IRN/87 (Esmail2) وجود دارد. ویروس A جدا شده با ویروس A واکسن ایران A/IRN/87V (Esmail1) نیز تشابه زیادی نشان داد (۹۰ درصد). از نظر فیلوژنیک با ویروس های A/IRN /iso105 A22/Iraq/92، در یک Lineage قرار می گیرند. نزدیکی ویروس (afroz) A/IRN/87 با ویروس تیپ A واکسن قابل مشاهده است اما این دو ویروس بدون در نظر گرفتن حذف بزرگ اسیدهای نوکلئیک (در ۳۹ جفت باز در ژن 1D این ویروس ها) با تیپ A جدا شده از استان مشابهت دارند. در انتهای 32 ناحیه 1D ژنوم این دو ویروس تفاوت هایی با یکدیگر و با ناحیه مشابه ژنوم ویروس A جدا شده، دیده می شود (حدوداً در ۱۶ اسید نوکلئیک).

شماره ۱ و ۲ - باند ۷۳۲ جفت بازی (تیپ A) شماره های ۳ و ۴ - باند ۴۰۲ جفت بازی (تیپ O). شماره ۵ - کنترل مثبت باند ۴۰۲ جفت بازی (تیپ O). شماره ۶ - مارکر ۱۰۰ جفت بازی (100bp).

### بحث

تب برفکی دشمن سرمایه دامی لقب گرفته است. ویروس تیپ A تب برفکی در سال ۱۳۳۹ برای اولین بار در ایران جدا شد که به نام A قدیم یا A شیراز معروف می باشد و در سال ۴۶-۱۳۴۳ تیپ دیگری از تبریز به نام A خاورمیانه جدا گردید (۱،۹). این ویروس نظیر ویروس های دارای RNA



## References

1. Firouzi, M. R., Amighi, M., Piroird, R., Lombard, M., Favere, H., Salehizadeh, M. (1985) The Foot and Mouth disease situation in Iran in 1980-1984-. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 4:311-317.
2. Kitching, R. P. (1998) A recent History of foot-and-mouth Disease. J. Comp. Pathol. 113:89-108.
3. Knowles, N. J., Samuel, A. R. (2003) Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. Virus Res. 91: 65-80.
4. Mahrevany, H., Keivanfar, H., Izadi, H., Salehizadeh, M., Taghizadeh, M., Sotudeh, M., Ghorashi, S., Ghafari, A. (2007) Genetic and antigenic analysis of type O and A FMD viruses isolated in Iran. Archives of Razi Institute. 62:63-65.
5. Marquardt, O., Freiberg, B. (2000) Antigenic variation among foot-and-mouth disease virus type A field isolates of 1997-1999 from Iran. Vet. Microbiol. 74:377-386.
6. Samuel, A. R., Knowles, N. J., Kiching, R. P. (1988) Serological and biochemical analysis of some recent type A foot -and -mouth disease virus from the Middel East. Epi. Inf. 101:577-590.
7. Semler, B. L., Wimmer, E. (2002) Molecular Biology of Picornaviruses. ASM Press. Washington, D. C, USA.
8. Vangrypserrwe, W., De Clerq, K. (1996) Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot and mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolation, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. Arch. Virol. 141:331-344.
9. Zibaei, S., Keivanfar, H., Rabbani, M., Kianizade, M., Hematzadeh, F., Bokaie, S. (2007) Identification of the foot and mouth disease foci from susceptible foci in Khorasan-Razavi province. J. Vet. Res. 62:151-155.

مشخص می‌گردد چرا که می‌توان از این استان به عنوان دروازه ارتباطی شرق دور با اروپا نام برد.

## تشکر و قدردانی

باتشکر از اعضای محترم شورای پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و شورای پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخاطر مساعدت‌های انجام گرفته. بدین وسیله از زحمات آقایان داود خانی، دکتر کارگر، دکتر ایزدی، دکتر صالح‌زاده، دکتر مهروانی، دکتر خراسانی، دکتر قرشی، دکتر بهاری، دکتر اسدزاده، دکتر ناظم شیرازی، دکتر دستور، دکتر رشتی باف، دکتر چرخکار، دکتر راعی، دکتر طالب‌شوشتری و سرکار خانم دکتر صدیقی مقدم و سرکار خانم بهجتی تشکر و قدردانی می‌گردد.



# COMPARATIVE STUDY ON 1D (VP1) REGION OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS (TYPE A STRAIN) AMONG DIFFERENT ISOLATES: KHORASAN RAZAVI ISOLATE AND OTHER IRANIAN AND NEIGHBORING COUNTRIES ISOLATES

Zibaei, S.<sup>1\*</sup>, Keivanfar, H.<sup>2</sup>, Rabbani, M.<sup>2</sup>, Hematzadeh, F.<sup>2</sup>, Kianizade, M.<sup>1</sup>, Fathi najafi, M.<sup>1</sup>, Farhodi, M.<sup>1</sup>, Hemmati, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Razi Vaccine and Serum Research Institute of Mashhad, Mashhad-Iran.

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 3 May 2008 , Accepted 9 September 2009)

---

## Abstract:

Foot -and- mouth disease (FMD) is one of the most important virus disease in farm animals. Types O, A and Asia1 FMD virus have been endemic in Iran. In these study, samples from suspected livestock were analyzed by RT-PCR experiment. The number of 702 nucleotides determined at 1D -2B region of type A strain isolated from Khorasan Razavi province sequenced and compared with that of other reported isolates type A from Iran and neighboring countries. The results show that field isolated type A has about 89% similarity with other reported isolates type A from Iran and neighboring countries. Furthermore, this virus shows the most similarity with A/IRN/1/87(Samuel). Phylogenetic analysis revealed that virus was closely related to A22-Iraq/99 and A/IRN/iso/105 that rest in the same lineage. The data showed high similarity between type A viruses involved in the Khorasan Razavi province and A/IRN/87v (vaccine strain); so that it can be concluded that the vaccine can produce prophylactic antibody against this virus.

**Keywords:** foot and mouth disease virus, type A, Khorasan- Razavi province.

\*Corresponding author's email: S.Zibaei@rvsri.com, Tel: 0511-8431780, Fax: 0511-8420430

