

اپیدمیولوژی مولکولی ویروس عامل بیماری تب برفکی در نشخوارکنندگان ایران در فاصله سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۸۴

همایون مهروانی^{۱*}، هادی کیوانفر^۲، فرهید همت زاده^۲، سعید بکایی^۳، حسن ایزدی^۱، مرتضی تقی زاده^۱، مسعود ستوده^۱

۱) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج - ایران.

۲) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی تهران، تهران - ایران.

۳) گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریور ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۲۷ خرداد ماه ۱۳۸۸)

چکیده

بیماری تب برفکی یک بیماری ویروسی شدیداً واگیردار نشخوارکنندگان است که موجب تب و ایجاد پوستانول در دهان و سینه آن‌ها می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی وضعیت آنتی ژنتیکی و ژنتیکی سویه‌های ویروس تب برفکی ایران طی سال‌های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵، و بررسی تغییرات آن‌ها و مقایسه ویروس‌های فیلد با یکدیگر و با سویه‌های موجود در واکسن موسسه رازی می‌باشد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها آزمایش‌های سرولوژیکی جهت تعیین تیپ و تحت تیپ و تلقیح به سلول IBRS2 به منظور جداسازی ویروس، آزمایش RT-PCR و PCR به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی (600bp) و آزمایش خنثی‌سازی ویروس جهت تعیین قرابت ایمونولوژیکی (r-Value) انجام شد. پس از انجام آزمایشات روی ۱۱۶۲ نمونه، ۲۴۱ مورد تیپ A05IR، ۱۲۵ مورد A87IR، ۷۹ مورد O، ۳ مورد Asia و ۷۱۴ مورد منفی تشخیص داده شد. متوسط میزان قرابت ویروس تیپ A جداسازی شده از نمونه‌ها با ویروس A87IR واکسن ۵۰ درصد و در مورد تیپ O جداسازی شده از نمونه‌ها با ویروس O shabestar واکسن ۹۲ درصد و این میزان در مورد ویروس Asia، ۹۷ درصد می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از r-Value و دندروگرام مقایسه‌ای، ویروس‌های تیپ A جداسازی شده از نمونه‌ها با ویروس A87IR واکسن قرابت زیادی نداشته و به همین دلیل ویروس جدید A05IR از نمونه‌ها جداسازی و پس از آزمایشات لازم به ویروس‌های قبلی موجود در واکسن اضافه گردید، در مورد ویروس‌های O و Asia قرابت زیادی با ویروس واکسن ساخت موسسه رازی دارند و نیازی به تغییر سویه در واکسن نیست. دندروگرام نیز نتایج را تایید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ویروس تب برفکی، قرابت آنتی ژنتیکی، اپیدمیولوژی مولکولی.

ایمنی علیه یک سرو تیپ قادر نیست علیه عفونت با دیگر سرو تیپ‌ها یا حتی تحت تیپ‌های خود سرو تیپ نقش محافظتی کامل داشته باشد (۲، ۱۷).

شناسایی دقیق و سریع بیماری، تعیین تیپ‌های ویروسی در گردش و مقایسه آن‌ها با یکدیگر و با سویه ویروس واکسن و بررسی خصوصیات ژنتیکی آن‌ها می‌تواند وضعیت اپیدمیولوژیکی بیماری و سیاست‌ها و ابزارهای کنترل و مبارزه را مشخص نماید و همچنین روش‌های بکار گرفته شده جهت این امر را ارزیابی کند.

مواد و روش کار

با کمک سازمان دامپزشکی کشور و مراکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان‌ها تعداد ۱۲۰۰ نمونه اپیتلیوم زبان از نشخوارکنندگان مبتلا به تب برفکی از کانون‌های درگیر با بیماری در سراسر کشور طی سال‌های ۱۳۸۴ و ۷ ماهه اول سال ۱۳۸۵ به آزمایشگاه تشخیص بخش تب برفکی موسسه رازی ارسال و آزمایش‌های ذیل انجام شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها: کلیه مراحل کار آماده‌سازی نمونه‌ها انجام شد. تایپینگ (تعیین سرو تیپ): آزمایش‌های سرولوژیکی capture ELISA و Sandwich و Complement Fixation Test (CFT) جهت تعیین تیپ و تحت تیپ ویروس برای کلیه نمونه‌ها انجام شد (۸). جدا سازی ویروس: با استفاده از سلول IBRS2 اقدام به جداسازی

مقدمه

تب برفکی یک بیماری ویروسی حاد و مسری با درصد شیوع بسیار بالا در میان حیوانات زوج سم اهلی و وحشی می‌باشد. در میان نشخوارکنندگان اهلی در درجه اول گاو و سپس گوسفند و بز نسبت به این بیماری حساس هستند (۱).

از علائم بارز این بیماری تب و ضعف عمومی و ظهور تاول‌های و زیکولی روی زبان، لثه‌ها، محوطه دهانی، نوک پستان‌ها و نیز زخم و تاول در تاج سم و بافت بین دو سم می‌باشد. میزان مرگ و میر به جز در حیوانات جوان بسیار کم است ولی بدلیل سرعت زیاد انتشار بیماری و نیز کاهش تولیدات دامی مانند شیر و گوشت و تحریم نجاری کشورهایی که تب برفکی در آنجا بروز می‌کند از مهمترین بیماری‌های دامی در جهان محسوب می‌گردد. به دلیل اهمیت بیماری تب برفکی این بیماری در لیست A دفتر مبارزه با بیماری‌های واگیر دام قرار گرفته است.

عامل مولد بیماری RNA ویروس از خانواده پیکورناویریده به نام آفتو ویروس است. ویروس تب برفکی دارای ۷ سرو تیپ و ۸۵ تحت تیپ (تیپ Subtype) است. این سرو تیپ‌ها O، A، C، Asia1، SAT1، SAT2، SAT3 هستند. تحت تیپ‌های متعددی که در هر یک از این سرو تیپ‌ها دیده می‌شود از نظر ایمونولوژیک و سرولوژیک با هم تفاوت دارند به طوری که



جدول ۱- توزیع فراوانی مطلق ونسبی سویه های جدا شده از مناطق مختلف ایران برحسب نوع دام در طی سال های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵.

نوع دام	تیپ		A ₀₅		A ₈₇		O		Asia		منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
گاو	۲۳۱	۲۲/۴	۱۱۶	۱۱/۳	۷۶	۷/۴	۳	۰/۳	۶۰۳	۵۸/۶	۱۰۲۹	۱۰۰		
گوسفند	۷	۶/۷	۷	۶/۷	۱	۰/۹	۰	-	۹۰	۸۵/۷	۱۰۵	۱۰۰		
گاو میش	۰	-	۰	-	۱	۳۳/۳	۰	-	۲	۶۶/۷	۳	۱۰۰		
بز	۲	۱۲/۵	۱	۶/۷۵	۱	۶/۷۵	۰	-	۱۲	۷۵/۰	۱۶	۱۰۰		
شتر	۱	۲۰/۰	۱	۲۰/۰	۰	-	۰	-	۳	۶۰/۰	۵	۱۰۰		
جمع	۲۴۱	۲۰/۸	۱۲۵	۱۰/۸	۷۹	۶/۸	۳	۰/۳	۷۱۰	۶۱/۳	۱۱۵۸	۱۰۰		

جدول ۲- نتایج حاصل از تعداد تیپ های ویروس تب برفکی تشخیص داده شده به تفکیک تجمیع فصول سال های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵.

فصل	تیپ		A ₀₅		A ₈₇		O		Asia		منفی		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
بهار	۲۷	۱۶/۱۰	۸	۴/۷۵	۸	۴/۷۵	۰	-	۱۲۵	۷۴/۴۰	۱۶۸	۱۰۰		
تابستان	۵۱	۱۰/۸۰	۴۳	۹/۱۰	۵۹	۱۲/۵۰	۱	۰/۲۰	۳۱۹	۶۷/۴۰	۴۷۳	۱۰۰		
پاییز	۱۰۸	۳۳/۲۰	۴۴	۱۳/۵۰	۱۰	۳/۲۰	۲	۰/۶۰	۱۶۱	۴۹/۵۰	۳۲۵	۱۰۰		
زمستان	۵۵	۲۸/۱۰	۳۰	۱۵/۳۰	۲	۱/۰۰	۰	-	۱۰۹	۵۵/۶۰	۱۹۶	۱۰۰		
جمع	۲۴۱	۲۰/۷۴	۱۲۵	۱۰/۷۶	۷۹	۶/۸۰	۳	۰/۳۰	۷۱۴	۶۱/۴۰	۱۱۶۲	۱۰۰		

بر اساس نتایج جدول فوق ملاحظه می گردد که درمورد تیپ A₀₅ بیشترین میزان آلودگی در نوع گاو (۲۲/۴ درصد) و کمترین میزان آلودگی در نوع گوسفند (۶/۷ درصد) می باشد و آزمون مربع کای ارتباط بین گونه حیوان و آلودگی به ویروس تیپ A₀₅ را کاملاً معنی دار می داند (۰/۰۱ < p < ۰/۰۵).

درمورد تیپ A₈₇ بیشترین میزان آلودگی در نوع شتر (۲۰ درصد) و کمترین میزان در نوع گوسفند (۷/۰ درصد) می باشد و آزمون مربع کای ارتباط بین گونه حیوان و آلودگی به ویروس تیپ A₈₇ را معنی دار ندانست (p = ۰/۵۱۷۱).

همچنین درمورد تیپ O بیشترین میزان آلودگی در نوع گاو میش (۳۳/۳ درصد) و کمترین آن در نوع گوسفند (۹/۰ درصد) می باشد و آزمون مربع کای ارتباط بین گونه حیوان و آلودگی به ویروس تیپ O را معنی دار دانست (۰/۰۱ < p < ۰/۰۵).

درمورد تیپ Asia آلودگی فقط در نوع گاو (۰/۳ درصد) می باشد و آزمون مربع کای ارتباط بین گونه حیوان و آلودگی به ویروس تیپ Asia را معنی دار ندانست (p = ۰/۷۶۰۶).

بر اساس نتایج حاصله بیشترین میزان آلودگی در فصل تابستان و سپس در پاییز است. میزان نتایج منفی در فصول بهار و تابستان نسبت به دو فصل دیگر بیشتر است، که این مسئله می تواند به دلیل گرمای هوا باشد که روی کیفیت نمونه تاثیر سوء می گذارد.

۱۴ ویروس تیپ A و ۵ ویروس تیپ O و ۲ ویروس Asia جدا شده در کشت سلول از نمونه های ارسالی و ۴ نمونه از ویروس های تیپ A و یک نمونه از ویروس تیپ O و یک نمونه از ویروس تیپ Asia موجود در بانک ویروسی بخش تب برفکی موسسه رازی (سویه های به کار رفته در واکنش) جهت انجام

ویروس از نمونه های ارسالی شد. کلیه نمونه ها پس از آماده سازی به سلول تلقیح شده و در پاساژهای اول، دوم و سوم با مشاهده آثار تخریب سلول (CPE)، که نشان دهنده وجود ویروس در نمونه است، ویروس جدا شده جهت آزمایش های تکمیلی در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد (۶).

آزمایش های تکمیلی ویروس های جدا شده به شرح زیر انجام گردید- تعیین r-Value (relationship value): به منظور تعیین قرابت ایمنولوژیک سویه های جدا شده از نمونه ها بایکدیگر و با ویروس های موجود در بانک ویروسی آزمایش خنثی سازی سرم (SNT) Test Serum Neutralization و آزمایش خنثی سازی دو بعدی ویروس (Double Dimension Virus Neutralization Test (DDVNT روی ۲۴ نمونه منتخب انجام شد (۱۲).

جدا سازی RNA: جدا سازی و تخلیص RNA ویروس با استفاده کیت (High pure viral RNA Kit (Roch, Swiss) و طبق دستورالعمل سازنده انجام شد.

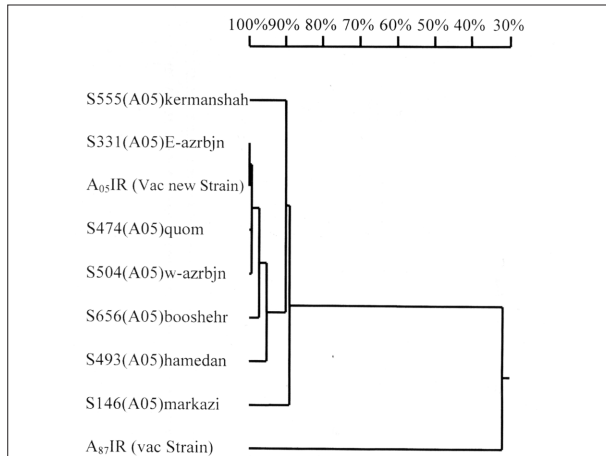
آزمایش RT-PCR: از پرایمرهای اختصاصی برای هر تیپ آزمایش RT-PCR و PCR روی نمونه ها انجام شد و پس از خالص سازی قطعه اسید نوکلئیک تکثیر یافته توسط کیت High pure PCR product (Swiss), نوکلئیک توالی نوکلئوتیدی از دو طرف تعیین گردید (۵).

تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی توسط نرم افزار DNAMAN مورد بررسی قرار گرفت و نمودار دندروگرام رسم گردید.

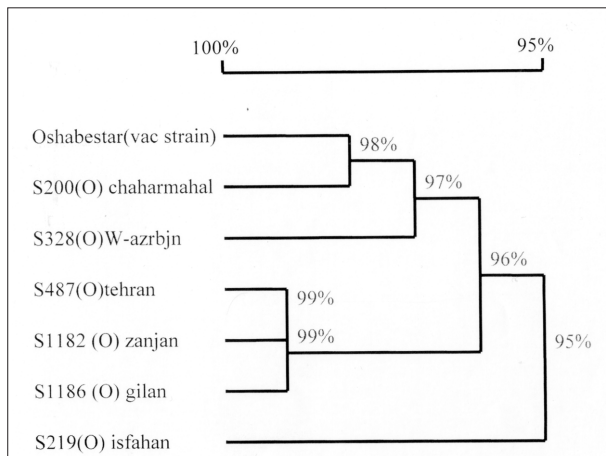
نتایج

جدول های ۱ و ۲ فراوانی و درصد نمونه های ارسالی را به تفکیک نوع حیوان، تیپ های ویروسی جدا شده و فصول نشان می دهند.

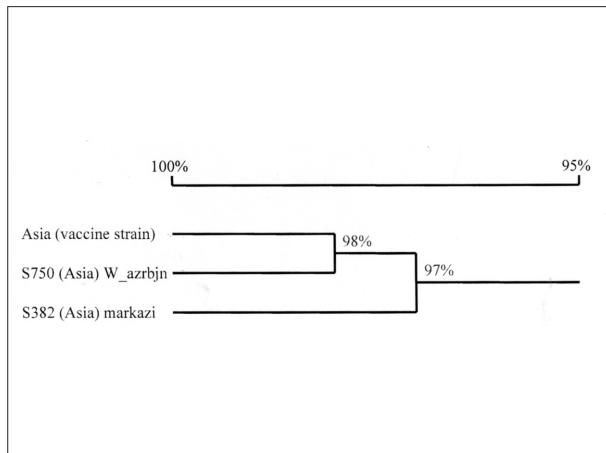




نمودار ۱- دندروگرام مقایسه‌ای ۶۰۰ نوکلئوتید قسمت ID (VP1) ژنوم ویروس‌های تیپ A جدا شده از استان‌ها با ویروس تیپ A87IR (مردآباد) واکسن موسسه رازی. خطوط عرضی درصد تشابه را با توجه به شاخص بالای نمودار مشخص می‌کند.



نمودار ۲- دندروگرام مقایسه‌ای ۶۰۰ نوکلئوتید قسمت ID (VP1) ژنوم ویروس‌های تیپ O جدا شده از استان‌ها با ویروس تیپ Oshabestar واکسن موسسه رازی.



نمودار ۳- دندروگرام مقایسه‌ای ۷۳۶ نوکلئوتید قسمت ID (VP1) ژنوم ویروس‌های تیپ Asia جدا شده از استان‌ها با ویروس تیپ Asia واکسن موسسه رازی.

شماره‌های دسترسی EF405981 جهت ویروس EF405982, A87IR جهت ویروس A961R, EF405980 جهت ویروس A221R, EF600683

جدول ۳- نتایج حاصل از تعیین قرابت (r-Value) بین ویروس‌های تب برفکی تیپ‌های A, O, Asia جدا شده از بعضی از استان‌ها با سویه‌های ویروس تب برفکی به کار رفته در واکسن موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی Asia1, O967, O shabestar, A05IR, A87IR (Razi Vaccine Strains). ** - ویروس جدا نشده است.

ویروس‌های تیپ A جدا شده از استان‌ها	A05IR سویه واکسن	A87IR سویه واکسن	O شیبستر سویه قدیم واکسن	O967 سویه جدید واکسن	Asia 1 سویه واکسن
تهران	۰/۷۹	۰/۴۵	۰/۸۱	۰/۸۸	**
قم	۰/۸۷	۰/۴۲	**	**	**
مرکزی	۱	۰/۳۶	۰/۸۹	۱	<۱
همدان	۰/۷۶	۰/۴۳	**	**	**
آذربایجان غربی	۰/۹۵	۰/۵۶	۰/۸۶	۰/۹۵	۰/۹۵
پوشهر	۰/۶۸	۰/۳۲	**	**	**
سمنان	۰/۴۶	۱	**	**	**
کردستان	۰/۶۷	۰/۴۱	**	**	**
اردبیل	۱	۰/۵۱	**	**	**
کرمان	۰/۴۲	۰/۸۵	**	**	**
چهارمحال	۰/۵۶	۰/۷۳	۰/۹۱	۰/۸۸	**
گلستان	۰/۷۹	۰/۴۶	**	**	**
گیلان	۰/۷۴	۰/۴۷	**	**	**
اصفهان	۰/۷۳	۰/۳۵	۰/۷۶	۰/۸۸	**
یزد	۰/۷۸	۰/۳۸	**	**	**
خوزستان	۰/۹۶	۰/۳۲	**	**	**
زنجان	**	**	۰/۷۷	۰/۹۴	**
میانه	۰/۷۵	۰/۵	۰/۹۱	۰/۹۲	۰/۹۷
انحراف معیار	±۰/۰۴	±۰/۰۵	±۰/۰۲	±۰/۰۲	±۰/۰۲

جدول ۴- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده تیپ‌های ویروس تب برفکی (۱۴). * - در صورتی که از پرایمر NK61 استفاده شود.

Primer	R/F	Sequence 5'-3'	Length(bp*) Amplicon
NK61	R	GACATGTCCTCCTGCATCTG	cDNA
NK72	R	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	cDNA
O-1C609	F	TAGTGCTGGTAAAGACTTTGAGCT	816
A-1C612	F	TAGCGCCGGCAAAGACTTTGA	813-816
Asia1-C616	F	GGCAAGGACTTTGAGTTTCGC	797-803

آزمایش‌های تعیین قرابت ژنتیکی و تعیین توالی نوکلئوتیدی انتخاب شدند. نتایج حاصل از r-Value و قرابت نمونه‌ها با ویروس‌های واکسن در جدول ۵ الی ۷ نشان داده شده است.

پرایمرهای استفاده شده در این بررسی که جهت آزمایش RT-PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی به کار رفته در جدول ۸ نشان داده شده است.

اگر از پرایمر NK72 استفاده شود طول قطعه تریپل یافته کوچک‌تر خواهد شد.

از پرایمر NK61 برای تهیه cDNA و از پرایمر NK72 به همراه پرایمرهای هر تیپ و بررسی جهت تهیه محصول PCR و تعیین ردیف اسید نوکلئیک استفاده شد (۶).

ردیف‌های نوکلئوتیدی تیپ‌ها و تحت تیپ‌های ویروس‌های واکسن به



اپیتلیوم زبان می‌توان مقدار قابل توجهی نمونه برداشت کرد که در آزمایش‌های تعیین تیپ و جداسازی ویروس تاثیر مستقیم دارد محققان معتقدند که بهترین نمونه مایع زیر تاول‌های اپیتلیوم زبان می‌باشد که میزان قابل توجهی ویروس دارد ولی به دلیل عدم دسترسی به چنین نمونه‌هایی در شرایط فیلداپیتلیوم زبان که بیشتر از ۲۴ ساعت از شروع بیماری نگذشته باشد مناسب است (۹).

بیشترین میزان آلودگی در این بررسی در فصول تابستان، پاییز و سپس بهار می‌باشد و همچنین بیشترین گزارش‌های منفی نیز در فصول بهار و تابستان است که این مسئله می‌تواند به دلیل گرمای تابستان و تاثیرگذاری آن بر روی کیفیت نمونه‌ها باشد.

ظهور ویروس جدید A₀₅ در اواخر تابستان ۱۳۸۴ و افزایش اپیدمی قبل از تهیه واکسن با ویروس مذکور باعث افزایش میزان آلودگی در پاییز ۱۳۸۴ شده است که پس از آن با استفاده از واکسن حاوی A₀₅ میزان آلودگی کاهش یافت.

تعیین توالی نوکلئوئیدها از ناحیه ID ویروس تب برفکی سوبه‌های واکسن با ویروس‌های جدا شده از نمونه‌ها مقایسه گردید.

علاوه بر تعیین توالی نوکلئوئیدی جهت مقایسه بهتر و دقیق‌تر آزمایش سرولوژیکی تعیین قرابت و مشخص شدن r-value ضروری است. البته این آزمایش در زمانی به کار می‌رود که نیاز به تعیین قرابت سویه فیلد با سویه واکسن باشد و این آزمایش در جهت انتخاب سویه مناسب جهت استفاده در واکسن جهت کنترل بیماری کاربرد دارد. به طوری که اگر میزان r-value با قرابت ویروس با یکدیگر بالاتر از ۰/۴ یا ۴۰ درصد باشد این دو ویروس با هم اختلاف چندانی ندارند و اگر بین ۰/۲ تا ۰/۴ یا ۲۰ تا ۴۰ درصد باشد اختلاف آن‌ها بیشتر است و قرابت کمتری با هم دارند و اگر زیر ۰/۲ باشد اختلاف آن‌ها زیاد است و قرابتی با هم ندارند (OIE Protocole). در شرایط عادی میزان قرابت بالای ۰/۴ به معنای عدم نیاز به تغییر سویه می‌باشد ولی هرچه این عدد به ۱ (۱۰۰ درصد) نزدیک‌تر باشد قرابت بیشتر است و در شرایط اپیدمی باید ویروسی برای واکسن انتخاب شود که بیشترین قرابت را دارد (۱۶).

در این مطالعه با بررسی‌های ژنومی و نیز تعیین متوسط r-value ویروس‌های تیپ A جدا شده از نمونه‌ها قرابت زیادی با سویه A₈₇IR موجود در واکسن نداشته و سویه جدید از نمونه‌ها جدا شده که به نام A₀₅IR نامگذاری شد و در واکسن مورد استفاده قرار گرفت.

این سویه توسط آزمایشگاه فرانس (WRL) نیز مورد آزمایش قرار گرفت و آن مرکز نیز عدم همخوانی آن را با سویه واکسن (A₈₇IR) تأکید نمود. در مورد ویروس O اختلافات کمتری از نظر r-value مشاهده شد. به طوری که ویروس‌های O جدا شده از استان‌های مرکزی، چهارمحال، آذربایجان غربی، تهران، زنجان و اصفهان با ویروس O واکسن (shabestar) از ۷۷ درصد تا ۹۱ درصد قرابت داشتند.

بر طبق گزارش مرکز فرانس (WRL) و OIE ویروس O بیشترین شیوع

جهت ویروس A₀₅IR، 1. AY593834 جهت ویروس O shabestar و 1. DQ121118 جهت Asia1 در بانک ژن به ثبت رسیده اند زمان، درجه حرارت، مقدار آنزیم و پرایمرهای به کار رفته در واکنش RT-PCR بر طبق دستورالعمل آزمایشگاه فرانس جهانی تب برفکی (WRL Laboratory World Reference) استفاده شد.

نتایج تعیین قرابت R Value ویروس‌های جدا شده از نمونه‌ها با ویروس‌های واکسن نشان می‌دهد که متوسط میزان قرابت ویروس تیپ A جدا شده از نمونه‌ها با ویروس A₈₇IR و واکسن ۰/۵ و با ویروس A₀₅IR (به کار رفته در واکسن جدید چهار ظرفیتی) ۰/۷۵ می‌باشد.

متوسط میزان قرابت ویروس تیپ O جدا شده از نمونه‌ها با ویروس O shabestar به کار رفته در واکسن ۰/۹۲ و این میزان در مورد ویروس Asia، ۰/۹۷ می‌باشد.

نتایج حاصل مقایسه تعیین توالی نوکلئوئیدی ویروس‌های جدا شده از نمونه‌ها با ویروس‌های واکسن و نمودار دندروگرام تایید کننده نتایج r Value می‌باشد.

نمودارهای ۱ تا ۳ نتایج دندروگرام‌های مقایسه‌ای بین ویروس‌های جدا شده از استان‌ها با ویروس‌های واکسن را نشان می‌دهد.

بحث

با بررسی پراکندگی جغرافیایی تب برفکی در جهان در می‌یابیم که ۷۵ درصد نقاط دنیا درگیر با این بیماری هستند و لذا تب برفکی همچنان تهدیدی برای کشورهای پاک می‌باشد (۱۳).

با توجه به خصوصیات ویروس عامل این بیماری از نظر تغییرات سریع ژنتیکی و بسیار مسری بودن تب برفکی سرعت در تشخیص تیپ و تحت تیپ ویروس در جهت سیاست‌گذاری در کنترل و مبارزه با آن نقش بسزایی دارد و به همین دلیل بیماری تب برفکی در لیست A تقسیم بندی بیماری‌های دامی سازمان OIE قرار گرفته است (۱۵).

در این بررسی از روش به کار گرفته شده در مرکز فرانس جهانی تب برفکی استفاده شده با این تفاوت که در این مطالعه از آزمایش تثبیت مکمل (CFT) نیز استفاده شد.

در مورد بیشترین و کمترین میزان آلودگی نسبت به تیپ‌های ویروسی مورد نظر در این مطالعه ارتباط آن با گونه حیوانی نشان دهنده ارتباط بین گونه حیوانی و ویروس‌های تیپ A₀₅ و O می‌باشد که A₀₅ در گاو و O در گاو همیشه ارتباط معنی دار دارد (۱۴).

محققان دیگر بر این عقیده‌اند که گوسفند تمایل بیشتری به تیپ O دارد (۱۱) ولی نتایج حاصل از این بررسی آن را تایید نمی‌کند که می‌تواند به دلیل نوع و کیفیت نمونه باشد، به طوری که در گوسفند به دلیل نداشتن علائم مشخص و واضح، برداشت نمونه مناسب و کافی بسیار مشکل است لذا اغلب نمونه‌های گوسفندی از مقدار و کیفیت مناسبی برخوردار نیست (۱۱). این در حالی است که در گاو به دلیل ضایعات مشخص مخاطی و جدا شدن



References

1. Amaral - Doel, C. M. F., Owen, N. E., Ferris, N. P., Kitching, R. P. Doel, T. R. (1993) Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimen and ethylenimine-inactivated preparation by the polymerase chain reaction. *Vaccine*. 11: 415 - 421.
2. Brown, C. C., Meyer, R. F., Olander, H. J., House, C., Mebus, C. A. (1992) A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using in situ hybridization. *Canadian J. Vet. Res.* 56: 189 - 193.
3. Brown, F. (2003) The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 91: 3-7.
4. Brown, F. (2003) The history of research in foot -and-mouth disease. *Virus Res.* 91: 3- 7.
5. Reid, S. M., Hutchings, G. H., Ferris, N. P., De Clerq, K. (1999) Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterization of viral RNA in clinical samples. *J. Virol. Methods.* 83: 113-123.
6. Reid, S. M., Ferris, N. P., Hutchings, G. H., De Clerq, K., Newman, B. J., Knowles, N. J., Samuel, A. R. (2001) Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR, use of phylogenetic data to evaluate primers for typing of viral RNA in clinical samples. *Arch. Virol.* 146: 2421-2434.
7. Davis, G. (2002) Foot and mouth disease. *Res. Vet. Sci.* 73: 195-199.
8. Ferris, N. P., Dowson, M. (1998) Routin application of enzyme-Linked immunosorbent assay in comparison with foot-and-mouth and swine vesicular disease. *Vet. Microbiol.* 16: 201-209.
9. 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. *Razi Institute Archive* 4: 311- 317.
10. Hughes, G. J., Miolet, V., Haydon, D. T., Kitching, R. P., Donaldson, A. I., Woolhouse, M. E. J. (2002) Serial passage of foot and mouth disease virus in sheep reveals declining levels of viremia over time. *J. Gen. Virol.* 83: 1907 - 1914.
11. Kitching, R. P., Hughes, G. J. (2002) Clinical variation in foot and mouth disease, sheep and goats. *Rev. Sci. Tech. off int. Epiz.* 21: 505-512.

را در جهان دارد و به نسبت ویروس تیپ A از تنوع ژنتیکی کمتری برخوردار است (۳،۷).

سکانس ۶۰۰ نوکلئوتیدی ویروس های تیپ A جدا شده از نمونه ها با سکانس مشابه سویه A₈₇IR واکسن بیانگر اختلاف ویروس تیپ A در حال گردش در فیلد در زمان انجام این مطالعه با ویروس واکسن می باشد. که بررسی های مرکز فرانس تب برفکی نیز این مسئله را تایید می کند. با جداسازی ویروس A₀₅IR و استفاده از آن در واکسن و با مقایسه سکانس این ویروس تشابه ۹۰ درصدی را با ویروس A فیلد می توان مشاهده کرد.

در مورد مقایسه سکانس ۶۰۰ نوکلئوتیدی ویروس تیپ O فیلد با سویه واکسن تشابه ۹۵ درصدی را می توان یافت که این سویه O فیلد همان سویه Pan Asia O می باشد که با سویه O واکسن قرابت دارد.

سکانس ۷۵۶ نوکلئوتیدی از ناحیه 1D ژن ویروس FMD سویه Asia جدا شده از استان های مرکزی و آذربایجان غربی و سویه واکسن قرابت ژنومی بسیار نزدیکی را نشان می دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقایان دکتر وحید عطار، دکتر داراب عبدالهی، دکتر سعید چرخکار، دکتر محسن شکوه مشکات، حمید سیامی و مراکز تحقیقاتی دامپزشکی استان ها جهت هماهنگی و ارسال نمونه و آقایان دکتر اکبر خراسانی، فرامرز جیرانی، مهدی تجاری و جعفر غفاری جهت یاری در انجام آزمایش ها صمیمانه تشکر و سپاسگذاری می شود.



12. 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.
13. Mason, P. W., Grubman, M. J., Baxt, B. (2003) Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res.* 91: 9-32.
14. Marvin, J. Grubman, M. J., Baxt, B. (2004) Foot-and-Mouth Disease. *Clin. Microbiol.* 17: 465-493.
15. Office International des Epizooties. (2002) Foot and mouth disease, Facing the new dilemmas, 21:3- 12.
16. Office International des Epizooties. (2000) Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, lists A and B disease of mammals, Foot-and-Mouth Disease. (4th ed.).
17. Saiz, M., Nunes, J. I., Jimenes, C. M. A., Baranowski, E., Sobrino, F. (2002) Foot-and-Mouth disease virus, biology and prospects for disease control. *Microb. Infect.* 4: 1183-1192.



MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN RUMINANT DURING 2005- 2006 IN IRAN

Mahravani, H.^{1*}, Keyvanfar, H.², Hemmatzadeh, F.², Bokaie, S.³, Izadi H.¹, Taghizadeh, M.¹, Sotudeh, M.¹

¹ Razi Vaccine and Serum Research Institute(RVSRI), Karadj - Iran.

² Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

³ Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

(Received 23 September 2008 , Accepted 17 June 2009)

Abstract:

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease of ruminant which causes fever and postule on mouth, hoof and teat. The main purpose of this study was to determine and charachtrize isolated FMD virus from Iran between 2005 - 2006, and to compare it with vaccine virus strains. After preparation of samples, serological test for typing of virus was performed. In order to virus isolation, the samples were inoculated to IBRS2 cell, RT-PCR and PCR were used for sequencing. Two dimentional virus neutralization test was carried out for detecting of immunological relationship (r value) between the field isolate and virus presented in vaccine. Detected strains were as follows: 241 samples of type A05IR, 125 of type A87IR, 79 of type 0, 3 of type Asia and 714 negative out of 1162 samples. Average r-values of type A, O, Asia field virus with vaccine strains were 50 -92% and 97%, respectively. Phylogenic tree was designed according to the nucleic acid sequencing data. There is not strong relationship between field viruses of type A and vaccine viruses. However a strong relationship was shown for type 0 and Asia ones with vaccine virus strains.

Key words: FMD virus, molecular epidemiology, phylogenic tree.

*Corresponding author's email: h. mahravani@rvsri. ir, Tel: 0261-4503897, Fax: 021-4502594

