مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۳، ۲۰۲ - ۱۹۹

مقایسه ناحیه 1D (VP1) ژنوم ویروس تب برفکی تیپ A جدا شده از استان خراسان رضوی با ویروس‌های جدا شده ازسایر استان‌ها و کشورهای همسایه

سعید زیبائی[1*] هادی کیوانفر[2] محمد ربانی[2] فرهید همت زاده[2] مهدی کیانی زاده[1] محسن فتحی نجفی[1] مجید فرهودی[1] محمد همتی[1]

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 مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی دام است. تیپ‌های A، O و Asia1 ویروس تب برفکی از دیرباز در ایران بومی می‌باشند. در این مطالعه نمونه‌های گرفته‌شده (۱۰۳ نمونه طی سه‌سال) از دام‌های مشکوک، توسط آزمایش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. ۷۰۲ نوکلئوتید ناحیه 1D تا 2B ژنوم ویروس تب برفکی تیپ A جداشده از استان خراسان رضوی تعیین توالی گردید و باسایر ویروس‌های ایران و منطقه مقایسه‌شد. در نتایج بدست‌آمده معلوم گردید که ویروس تیپ A جداشده ۸۹ درصد مشابهت با ویروس‌های ایران و کشورهای همسایه دارد. به‌علاوه 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 ویروس‌های A22/Iraq/92 و A/IRN /iso105 نزدیک بوده و با آنها در یک Lineage قرار می‌گیرد. اطلاعات نشان می‌دهد که ویروس تب برفکی تیپ A جداشده 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.

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

مقدمه

تب برفکی یکی از مهم‌ترین بیماری ویروسی دام است، این بیماری بشدت واگیردار بوده و تمامی زوج سمان را درگیر می‌نماید. عامل بیماری تب برفکی ویروسی RNA دار از خانواده پیکورناویریده و از جنس آفتوویروس است که هفت سرتیپ (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 سروتیپ اروپائی - آسیایی و یکی از ویروس‌های در گردش مهم در خاورمیانه است که در ایران نیز وجود دارد. ناحیه ژنومی 1D مسئول صدوررمز برای تولید مهمترین پروتئین آنتی ژن سطحی ویروس (VP1) می‌باشد. با مطالعه فعالیت مناطقی از VP1 و نیز تعیین توالی این منطقه در سروتیپ‌های مختلف FMDV معلوم شد که بیشترین تغییرات آنتی ژنیک مربوط به مناطقی از ژنوم ویروس است که اسید آمینه‌های ۱۴۱ تا ۱۶۰ را رمزدهی می‌نمایند. اسید آمینه‌های این منطقه تولید آنتی بادی محافظت کننده می‌نمایند. منطقه دیگر متغییر Vp1 اسید آمینه‌های ۲۰۰-۲۱۳ در انتهای C می‌باشد (۳،۷) هدف از این مطالعه مقایسه ناحیه (VP1) 1D ژنوم ویروس تب برفکی تیپ A جدا شده از استان خراسان رضوی با ویروس‌های جدا شده از ایران و کشورهای همسایه است که سکانس ناحیه 1D آنها در بانک ژن NCBI موجود می‌باشد.

مواد و روش کار

۱- نمونه‌گیری و آماده سازی نمونه: در این بررسی تعداد ۱۰۳ نمونه از دام‌های مشکوک به بیماری تب برفکی طی سه سال (از بهار ۱۳۸۳ لغایت اول تابستان ۱۳۸۶) گرفته شد. ضایعات لثه و زبان دام‌های مشکوک به بیماری تب برفکی اخذ و داخل بافر فسفات حاوی ۵۰ درصد گلیسرول به آزمایشگاه ارسال شد و سپس سوسپانسیون ده درصد از نمونه‌ها با استفاده از آب مقطر فاقد RNase تهیه گردید(۷،۹).

۲- استخراج RNA: جهت استخراج از کیت استخراج RNA (3 Tripur ,Roche-version) برمبنای روش کومنزنیسکی و ساچی استفاده گردید(۸،۹).

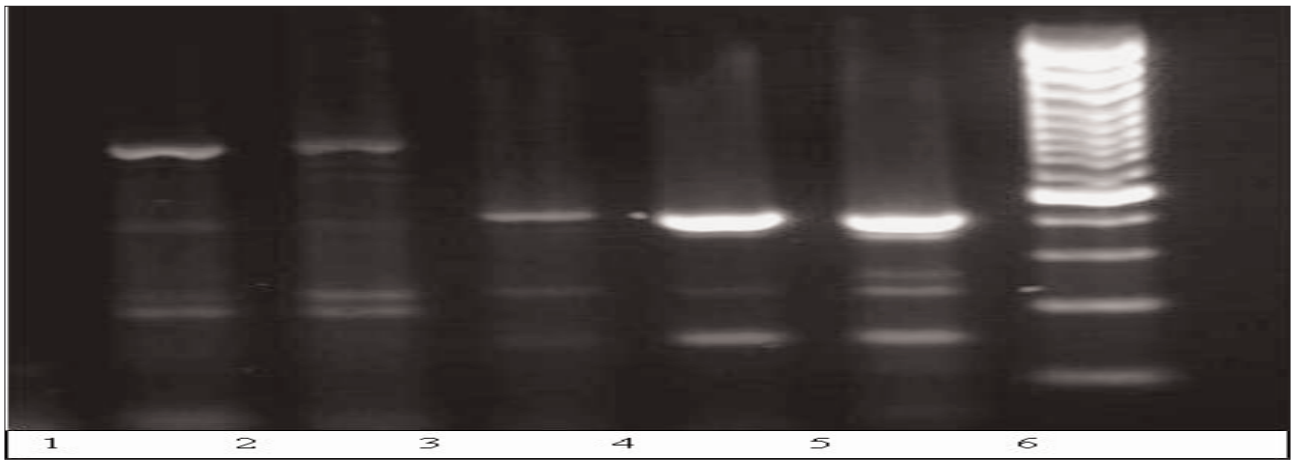
۳- رونوشت برداری معکوس: بر اساس روش Vangrysperrwe و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام گرفت (۸).

۴- واکنش PCR نیز بر اساس روش Vangrysperrwe و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام گرفت (۸).

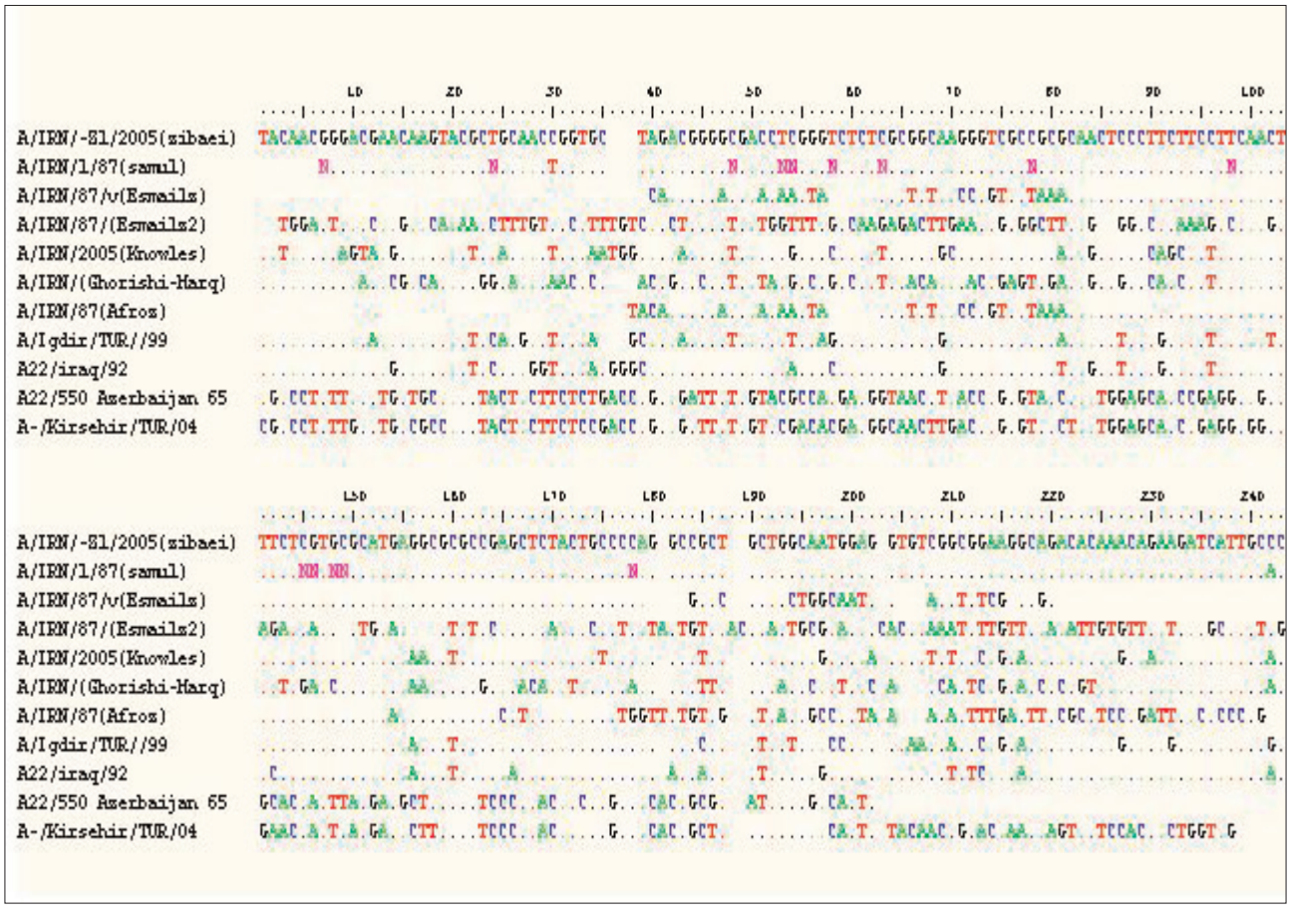
۵- شناسایی محصول PCR محصول PCR جهت ارزیابی در ژل آگارز دو درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

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 High pure PCR product purification Kit (Roche/Germany)، محصول PCR خالص و تعیین توالی نوکلئوتیدی توسط شرکت Microsynth - کشور سوئیس انجام گرفت.

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۵۱۱-۸۴۳۱۷۸۰ نمابر: ۰۵۱۱-۸۴۲۰۴۳۰ Email: S.Zibaei@rvsri.ir



تصویر ۱ـ نتایج حاصل ازالکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز دو درصد.

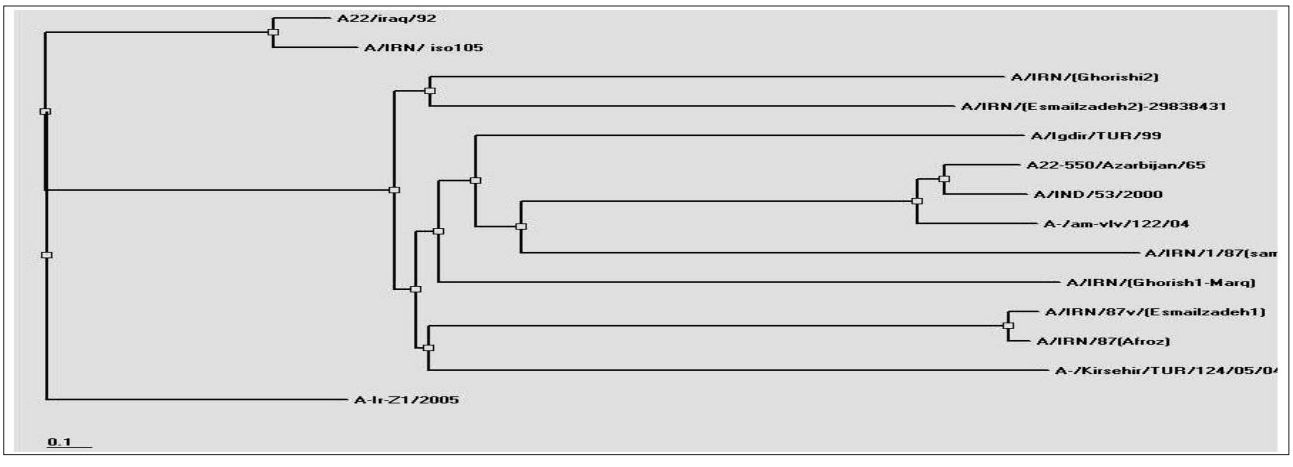


تصویر ۲ـ مقایسه ۲۵۰ نوکلئوتید از ناحیه انتهای 1D ژنوم ویروس تب برفکی تیپ A جدا از استان خراسان رضوی با تیپ‌های A ایران وکشورهای همسایه.

۷-بررسی مولکولی: در این تحقیق پس از شناسائی و تعیین تیپ ویروس تب برفکی توسط RT-PCR تعیین توالی نوکلئوتیدی ویروس تیپ A جداشده از استان با ویروس‌های جدا شده از منطقه در ناحیه مورد نظر (1D) مقایسه گردید. سپس با استفاده از نرم افزار BioEdit میزان تشابه نوکلئوتیدی این ویروس‌ها مورد ارزیابی قرارگرفت. آنگاه دندروگرام فیلوژنیک ویروس‌های تب برفکی تیپ A جدا شده همراه با مقایسه آنها با سایرویروس‌های تب برفکی تیپ A منطقه رسم شد.

نتایج

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



تصویر ۳ ـ 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.

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 می‌گردد که سوش مورد نظر ویروس تب برفکی تیپ A می‌باشد.

در این مقایسه معلوم شد که بیشترین تشابه اسیدهای نوکلئیک بین ویروس جداشده از استان خراسان رضوی و (A/IRN/1/87(Samuel (حدوداً ۹۲درصد) وجود و کمترین تشابه با ویروس دیگری از ایران (A/IRN/87(Esmailz2 وجود دارد . ویروس A جدا شده با ویروس A واکسن ایران (A/IRN/87V (Esmailz1 نیز تشابه زیادی نشان داد (۹۰درصد). از نظر فیلوژنیک با ویروس‌های A/IRN /iso105 A22/Iraq/92, در یک Lineage قرار می‌گیرند. 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 درژن 1D این ویروس‌ها) با تیپ A جدا شده از استان مشابهت دارند. در انتهای 32 ناحیه 1D ژنوم این دو ویروس تفاوت‌هایی با یکدیگر و با ناحیه مشابه ژنوم ویروس A جدا شده، دیده می‌شود (حدوداً در ۱۶ اسید نوکلئیک).

شماره ۱ و ۲ ـ باند ۷۳۲ جفت بازی (تیپ A) شماره‌های ۳ و ۴ ـ باند ۴۰۲ جفت بازی (تیپ O). شماره ۵ ـ کنترل مثبت باند ۴۰۲ جفت بازی (تیپ O). شماره ۶ ـ 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 به‌نام A قدیم یا A شیراز معروف می‌باشد و در سال ۴۶-۱۳۴۳ تیپ دیگری از تبریز به نام A خاورمیانه جدا گردید (۱،۹). این ویروس نظیر ویروس‌های دارای RNA به‌دلیل این‌که قدرت بهره‌جویی از مکانیسم اصلاح اشتباه در حین نسخه‌برداری و تکثیر ژنومی را ندارند دچار موتاسیون‌های زیاد می‌گردند(۷،۹). نتایج این بررسی با فرض تغییرات بیشتر اسید نوکلئیک تیپ A در منطقه ژنی 1D به نسبت سایر تیپ‌ها کاملاً هم خوانی دارد. اسیدهای آمینه منطقه VP1 ویروس جدا شده دچار تغییرات زیاد در اسیدهای آمینه ۱۳۵ تا ۱۵۷ پروتئین VP1 می‌باشد. لوپ G-H که بیشترین آنتی بادی خنثی کننده بر علیه آن تولید می‌شود در این ناحیه قرار دارد (۱،۷). طی سال‌های ۸۷-۱۹۸۶ ویروس تب برفکی تیپ A از اپیدمی‌های عربستان سعودی و ایران جدا شدند. ویروس‌هایی که جدا شده بودند از لحاظ آنتی ژنیک با سروتیپ A22 (A22/Iraq/64) فرق داشتند. سکانس مستقیم ناحیه VP1 این ویروس‌ها نشان داد که حداقل دو واریانت متفاوت FMD تیپ A با هم‌دیگر در خاورمیانه در حال گردش هستند. که هر دوی این‌ها با ویروس کلاسیک A22 تفاوت دارند (۵،۶). در کشور ما تغییرات آنتی ژنیکی و پیدایش تحت تیپ‌های جدید ویروس A در سال‌های اخیر نسبت به سال‌های گذشته شدت بیشتری پیدا نموده است به‌طوری‌که در یک دهه گذشته حداقل چهار تحت تیپ A تب برفکی (که با سوش‌های شناخته شده و مورد استفاده در واکسن 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 می‌دارند که، ایران و عراق در خاورمیانه بیشترین شیوع FMD را دارند و این شیوع در ایران به‌خاطر واریانت‌هایی از ویروس A اتفاق می‌افتد که توسط سویه واکسن قابل کنترل نیست و منبع آن نامعلوم است (۲). اما به‌نظر نمی‌رسد که ویروس A جدا شده در استان واریانی از تیپ A باشد که واکسن نتواند آن را تحت پوشش قرار دهد. این امر در مورد شیوع تیپ A جدید ایران 05 /A/IRN مصداق دارد(۴). با توجه به مرزی بودن استان خراسان رضوی و با نظر به بروز واریانت‌های جدید تب برفکی در شرق دور و نیز با نگاه به موقعیت تب برفکی در اروپا، اهمیت این استان برای انتقال این بیماری

مشخص می‌گرددچرا که می‌توان از این استان به‌عنوان دروازه ارتباطی شرق دوربا اروپا نام برد.

تشکروقدردانی

باتشکرازاعضای محترم شورای پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و شورای پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی بخاطر مساعدت‌های انجام گرفته. بدین‌وسیله از زحمات آقایان داود خانی، دکتر کارگر، دکترایزدی، 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 سرکارخانم دکتر صدیقی مقدم و سرکار خانم بهجتی تشکروقدردانی می‌گردد.

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. Vangrysperrwe. 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.

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.[1*], Keivanfar, H.[2], Rabbani, M.[2], Hematzadeh, F.[2], Kianizade, M.[1], Fathi najafi, M.[1], Farhodi,M.[1], Hemmati, M.[1]

[1]*Razi Vaccine and Serum Research Institute of Mashhad, Mashhad-Iran.*

[2]*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). Phylogenitic 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**