



عنوان طرح پژوهشی:
بررسی مولکولار اپیدمیولوژی ویروسهای در گردش تب برفکی
و مقایسه قرابت آنتی ژنیسته آن با ویروس های واکسینال خراسان رضوی

دستگاه سفارش دهنده (کارفرما):
اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی

مجری طرح پژوهشی:
دکتر سعید زیبائی
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

همکاران: دکتر مریم ترابی، دکتر ناصر مرگان ازغدی، دکتر محمد رشتی باف، دکتر حمیدرضا
فرزین، دکتر اکبر خراسانی، دکتر جعفر عطارباشی، دکتر لیلا باغی، علی زواری، امیر نوروزی

سال ۱۳۹۸

بسم الله الرحمن الرحيم



سازمان دامپزشکی کشور

اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی

عنوان طرح پژوهشی:

بررسی مولکولار اپیدمیولوژی ویروسهای در گردش تب برفکی

و مقایسه قرابت آنتی ژنیسته آن با ویروس های واکسینال خراسان رضوی

دستگاه سفارش دهنده (کارفرما):

اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی

مجری طرح پژوهشی:

دکتر سعید زیبائی

عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

همکاران: دکتر مریم ترابی، دکتر ناصر مرگان ازغدی، دکتر محمد رشتی باف، دکتر حمیدرضا

فرزین، دکتر اکبر خراسانی، دکتر جعفر عطارباشی، دکتر لیلا باغی، علی زواری، امیر نوروزی

سال ۱۳۹۸

نام آفرنده
کبه قلم و آفرینی نوین گوناگون

علم و تحقیق کلید قطعی پیشرفت کشور است. ((مقام معظم رهبری))

پژوهش، فرآیند تولید علم است و تولید فناوری به کارگیری یافته های پژوهشی است و تاثیرگذاری پژوهش و فناوری در تمدن کنونی دنیا و در آینده ی آن بسیار روشن و بدیهی است. ارتقای جایگاه پژوهش با افزایش اعتماد به نفس ، اراده ی مستقل و پذیرش خطر تجربه ، در بوجود آمدن ساختارهای دانایی محور و تقویت این مهم نقش محوری دارد. نظر به اسناد بالا دستی توسعه علمی کشور و نیز به جهت رفع نیازهای واقعی جامعه، با استعانت از خداوند متعال طرح پژوهشی

*** بررسی مولکولار اپیدمیولوژی ویروس های در گردش تب برفکی**

و مقایسه قرابت آنتی ژنیسته آن با ویروس های واکسینال خراسان رضوی *

در راستای اجرای دستورالعمل انجام طرح های پژوهشی تکالیف قانون بودجه سال ۱۳۹۸ و پس از تایید موضوع فوق در کارگروه تخصصی آموزش و فن آوری و نوآوری استان خراسان رضوی به انجام رسیده است .

بدین وسیله از کلیه دست اندرکاران اجرای طرح شامل مجری گرامی ، دستگاههای اجرایی از جمله کمیته آموزش و پژوهش دامپزشکی استان ، دبیرخانه محترم کارگروه آموزش و پژوهش و فناوری و نوآوری خراسان رضوی، دانشگاه محترم فردوسی مشهد، سازمان مدیریت و برنامه ریزی خراسان رضوی و استانداری محترم خراسان رضوی و نیز همکاران عزیز اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی که به هر نحوی در مراحل مختلف بررسی ، تصویب ، نمونه برداری، آزمون ، پردازش ، تحلیل ، نتیجه گیری و در نهایت تدوین کتابچه حاصل تلاش و پشتیبانی نموده اند ، تقدیر و تشکر می گردد.

امید است اجرای تحقیقات کاربردی دستمایه مناسبی در راستای کنترل و پیشگیری از بیماریهای مشترک بین انسان و دام ، بیماریهای واگیر دامی و تامین امنیت غذایی از راه کنترل فرآورده های خام دامی، به منظور اجرای بهتر خدمت رسانی به مردم مهربان کشور عزیزمان جمهوری اسلامی ایران ایجاد کند .

دکتر احمد شیری

مدیرکل دامپزشکی خراسان رضوی

فهرست

۶.....	چکیده
۸.....	۱-مقدمه
۱۲.....	۲-کلیات
۲۸.....	۳-مواد و روش ها
۵۳.....	۴-نتایج
۹۲.....	۵-بحث
۱۰۳.....	۶-منابع
۱۱۱.....	۷-ضمیمه

چکیده

بیماری تب برفکی در ایران اندمیک است (سروتیپ های A-O-Asia1) و از سیستم واکسیناسیون برای کنترل بیماری استفاده می گردد. آگاهی از وضعیت ژنتیکی سویه های در گردش سبب پیش بینی وقوع احتمالی همه گیری های شدید خواهد شد و یا حتی ممکن است موجب تصمیم گیری برای تغییر سویه های واکسینال گردد. طرح حاضر سویه های در گردش فیلد را طی یک سال (از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ماه ۱۳۹۹) پایش ژنومی نموده و قرابت ژنتیکی و آنتی ژنتیکی آنها را با ویروس های ثبت شده در بانک ژنی و ویروس های موجود در واکسن تب برفکی تولید شده در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بررسی نمود. در طرح حاضر پس از ارسال نمونه توسط دامپزشکان، آماده سازی اولیه نمونه برای آزمایش های تشخیص انجام گرفت. از آزمایش های الیزا و Real-Time PCR برای تشخیص ویروس و تیپ های ویروس تب برفکی در استان استفاده گردید. در ادامه آزمایش های کشت سلولی و RT-PCR جهت جدا سازی ویروس و تعیین توالی ژنومی ناحیه 1D ژنوم ویروس تب برفکی برای بررسی مولکولار اپیدمیولوژی ویروس در گردش، انجام گردید. همچنین آزمایش دو بعدی خنثی سازی ویروس که برای توصیف رابطه بین سروتیپ های در گردش با سویه های واکسن مورد مصرف استفاده می شود، انجام گرفت. نتایج طرح نشان داد که در طرح حاضر از تعداد ۱۶۸ نمونه ارسالی به آزمایشگاه ۸۶ نمونه متعلق به گاو و ۸۲ نمونه متعلق به گوسفند بود. که از ۱۰۳ نمونه مثبت ۱۰۲ نمونه با استفاده از آزمایش Real Time PCR مثبت تشخیص داده شد و تنها یک نمونه از نظر آزمایش الیزا مثبت و از نظر آزمایش Real Time PCR منفی تشخیص داده شده است. اما با آزمایش الیزا ۸۸ نمونه از ۱۶۸ نمونه ارسالی مثبت بودند که ۱۴ نمونه از نظر آزمایش Real Time PCR مثبت بوده ولی در آزمایش الیزا منفی تلقی می شوند. این موضوع بیانگر این واقعیت است که با توجه به گران بودن کیت الیزا در شرایط حاضر می توان از آزمایش Real Time PCR بعنوان جایگزین آزمایش الیزا برای تشخیص تب برفکی استفاده نمود.

۳۴/۵۲ درصد نمونه های مشکوک با آزمایش جدا سازی ویروس در کشت سلولی مثبت تشخیص داده شدند. که از این تعداد ۳۳/۳۳ درصد متعلق به گوسفند و ۳۵/۷۲ درصد متعلق به گاو می باشد. تعیین توالی نوکلئوتیدی سه ویروس تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی که تیپ O بودند با اسیدهای نوکلئیک ناحیه

مشابه ژنوم ویروس های تب برفکی تیپ O جدا شده از استان خراسان رضوی ، ایران و کشورهای همسایه، نشان داد که دو ویروس جدا شده از استان (گاو- شهرستان چناران O-As2-Ir-KR و O-As1-Ir-KR) بیش از ۹۹٪ مشابهت دارند اما هر کدام از این ویروس ها با ویروس تعیین توالی شده از شهر نیشابور (O-Ni-Ir-KR) ۱۲ درصد فاصله نشان دادند. اما هر ویروس تعیین توالی شده از نیشابور تشابه بیشتری با ویروس ثبت شده در بانک ژن MN539142.1-O/IRN/93/2016 (ژنوم ویروس واکسینال) را نشان می دهد. ژنوم ویروس های A تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی (A-As-IR-KR-2019 ---Ni-As-IR-KR-2019) پس از تعیین توالی نوکلئوتید با استفاده از عملیات بلاست (پایگاه NCBI) و نیز نرم افزار BioEdit و MEGA با ناحیه مشابه تعدادی از ویروس های A تعیین توالی شده در ایران، ترکیه، عراق ، افغانستان و ترکمنستان مقایسه گردید. این مقایسه نشان می دهد که اسیدهای نوکلئیک بین ویروس استان A- Ni-IR-KR-2019 و A-AS- IR-KH-2019 اختلافی ندارند اما با ویروس های بکار رفته در واکسن حدودا ۱۲ درصد اختلاف نشان می دهند.

مقایسه قرابت آنتی ژنیسته ویروس جدا شده با ویروس استفاده شده برای ساخت واکسن در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، (سه ویروس تیپ O جدا شده از استان خراسان رضوی در سال های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ با ویروس های بکار رفته در واکسن) نشان داد که در هر سه مورد محاسبه، ضریب شباهت آنتی ژنیتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن (r-value) بزرگتر از ۰/۳ می باشد. این امر حاکی از آن است که واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدرت تولید آنتی بادی محافظتی و ایجاد ایمنی لازم در برابر بیماری تب برفکی را داشته است. و تا زمانی که میزان اختلاف آنتی ژنیستی ویروس های در گردش در استان خراسان رضوی با ویروس رفرنس در اثر موتاسیون های ویروسی و یا انتقال ویروس از کشور ها و یا استانهای همسایه بیشتر از ۰/۳ نشده باشد تزریق واکسن یاد شده برای کنترل بیماری تب برفکی مناسب خواهد بود.

۱- مقدمه:

بیماری تب برفکی (FMD) یکی از مسری ترین بیماری های ویروسی دام است که خسارت اقتصادی زیادی را به صنعت دامپروری وارد کرده است و یکی از تهدیدهای تجارت دام و فرآورده های دامی در سراسر جهان محسوب می شود.

ویروس عامل بیماری تب برفکی از خانواده پیکورناویریده و از جنس آفتوویروس است که دارای هفت سروتیپ C, O, A, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3 و تحت سروتیپ های متعددی می باشد. عامل بیماری با قدرت گسترش بسیار زیاد از راه های تنفسی، گوارشی و تماس مستقیم منتقل می گردد. این ویروس می تواند بیش از ۷۰ گونه از جمله نشخوارکنندگان اهلی و وحشی را آلوده نماید. عوامل متعددی سبب اهمیت این بیماری می شوند، که برخی از آنها عبارتند از: تعدد تیپ ها و سروتیپ های ویروس عامل بیماری، توان بالقوه بسیار زیاد برای ایجاد موتاسیون و در نتیجه تغییرات سریع آنتی ژنیک، قابلیت بقاء ویروس در طبیعت به میزان زیاد، قابلیت گسترش سریع (شدت واگیری ۱۰۰٪)، پیچیده بودن چرخه انتقال و تعدد عوامل مداخل در این چرخه، دور ماندن علائم کلینیکی در اثر ابتلا به بعضی از تحت تیپ های خاص، و در بعضی از دامها بخصوص گوسفند، قدرت انتقال بین گونه ای، شکل گیری حاملین، هزینه بسیار زیاد کنترل و مبارزه، هزینه زیاد تشخیص و دست آخر اعمال مقررات سنگین بین المللی برای کشورهای که واجد بیماری می باشند.

تفاوت بین سروتیپ ها بر اساس منطقه جغرافیایی بوده و ایمنی متقاطع بین سروتیپ ها و تحت تیپ ها وجود ندارد. واکسیناسیون بر علیه یکی از سروتیپ های در برابر سایر سروتیپ های ویروس

¹Foot and Mouth disease

تب برفکی ایمنی ایجاد نمی‌نماید، لذا برای کنترل بیماری از طریق واکسیناسیون باید واکسنی اختصاصی از همان سویه خاص تولید گردد و در همان منطقه استفاده شود هر چند پیش بینی این امر که قبل از واکسیناسیون کدام سروتیپ در منطقه شیوع می‌یابد، سخت است از طرف دیگر این ویروس فاقد سیستم اصلاح اشتباه در حین نسخه برداری بوده و در زمان تکثیر ژنومی، جهش‌های پی در پی در این ویروس اتفاق می‌افتد و منجر به ظهور تغییرات ژنتیکی و آنتی ژنیک می‌گردد، بنابراین می‌بایست واکسن‌های جدید علیه سویه جهش یافته تولید نمود. علاوه بر جهش، انتخاب هم یکی از علل مهم تغییرپذیری این ویروس به حساب می‌آید که قابلیت تغییرپذیری بالای RNA این ویروس منجر به ظهور هفت سروتیپ متفاوت از لحاظ ایمونولوژی بسته به درجه انتخاب شده است. اصولاً تمام کشورهای جهان در ارتباط با بیماری دارای سه وضعیت کلی هستند. برخی از کشورها عاری از بیماری‌اند، بعضی دیگر با اعمال واکسیناسیون و قرنطینه بیماری را تحت کنترل در آورده و تنها در مواردی اندک وقوع بیماری در آنها گزارش می‌شود و دست آخر، کشورهایی که بیماری در آنجا بومی است. بیماری تب برفکی در خاورمیانه از جمله ایران بومی می‌باشد. کنترل بیماری در چنین کشورهایی کاریست بسیار سخت و پرهزینه و اساس کنترل بر پایه واکسیناسیون جمعیت دامی استوار است.

واکسن‌های متداول یا سنتی FMD با استفاده از کشت سلولی (BHK21)¹ تهیه می‌شوند. ویروس تکثیر شده در این سلول‌ها توسط موادی شیمیایی مانند اتیلن ایمین مضاعف (BEI)² غیر فعال می‌گردد.

¹ Baby Hamster Kidney

² Binary ethylenimine

تب برفکی از سال ۱۳۳۰ در ایران گزارش شده و در سال ۱۳۳۵ تیپ O ویروس تب برفکی برای اولین بار جدا گردید. از آن زمان به بعد هر از چند گاه کشور درگیر همه‌گیری‌های ناشی از تیپ‌های O، A، Asia₁ بوده است. در چند سال اخیر که سیاست کاربردی تزریق همزمان واکسن تب برفکی با قدرت پوششی مناسب شاهد کاهش بیماری بخصوص در دامداری‌های صنعتی بوده‌ایم.

باید در نظر داشت که همسایگان ما کشورهایی هستند که نه تنها بیماری در آنها بومی است بلکه بعضاً مبارزه با این بیماری در بعضی از این کشورها نظیر افغانستان، با علامت سؤال مواجه می‌باشد. خسارت اولیه بیماری در کشورهای بومی (طبق آنچه OIE برآورد نموده) شامل ۲۵٪ کاهش تولید گوشت، ۲۵٪ کاهش تولید شیر، ۲۵٪ کاهش تولید پشم و ۵٪ تلفات در دامهای جوان می‌باشد. علاوه بر آن خسارت ثانویه از جمله هزینه شناسایی، کنترل و پیشگیری نیز طاقت‌فرساست. اما ترس از بیماری نه تنها برای کشورهای اندمیک آزاردهنده می‌باشد بلکه تهدید احتمال سرایت آن به کشورهای پاک نیز حاشیه امنیت آنها را با خطر مواجه کرده است. چنانچه نگاهی به پدیده بیوتروریسم اقتصادی داشته باشیم، وسعت میدان مبارزه بسیار وسیع‌تر می‌گردد. در این میان استانهای مرزی نظیر استان خراسان رضوی نقشی تعیین کننده دارند.

استان خراسان رضوی با وسعتی بیش از ۱۲۷ هزار کیلومتر مربع، بین مدار جغرافیایی ۳۳ درجه و ۳۰ دقیقه تا ۳۷ درجه و ۴۱ دقیقه عرض شمالی از خط استوا و ۵۶ درجه و ۱۹ دقیقه تا ۶۱ درجه و ۱۸ دقیقه طول شرقی از نصف النهار گرینویچ قرار گرفته است.

این استان از شمال و شمال شرقی دارای حدودا ۵۳۱/۶ کیلومتر مرز مشترک با جمهوری ترکمنستان و از شرق حدودا ۳۰۲ کیلومتر مرز مشترک با کشور افغانستان می‌باشد. از نظر مرزهای

داخلی از شمال غربی با استان خراسان شمالی از جنوب با استان خراسان جنوبی و از غرب و نیمه شمال غربی به استانهای یزد ، سمنان محدود می شود.

با نظر به مرز طولانی این استان با دو کشور افغانستان و ترکمنستان می توان به حساسیت کنترل بیماری تب برفکی در این استان پی برد. در این مطالعه سعی شده است ضمن استفاده از آزمایش مولکولی برای تشخیص و تعیین تیپ سویه های درگیر در استان و مقایسه آن با آزمایش معمول همچنین جدا سازی و نیز تعیین توالی اسید نوکلئیک ویروس های در گردش در استان و مقایسه ژنتیکی زنوم ویروس در گردش در استان با ویروس قبل و نیز ویروس های ایران و کشور های همسایه که در بانک ژن ثبت شده اند، انجام شد. همچنین ویروس های جدا شده از استان از نظر آنتی ژنتیکی با ویروس واکسینال (سویه ای که از آن در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی واکسن تب برفکی می سازند) مقایسه گردید.

۲- کلیات

تاریخچه بیماری در ایران:

ویروس تب برفکی تیپ **O** برای اولین بار در سال ۱۳۳۵ در ایران جدا شد و از آن پس همه ساله واگیری های متعددی در اثر این تیپ بروز می کند و هم اکنون نیز از ویروسهای مهم در گردش محسوب می شود. ویروس تیپ **A** تب برفکی در سال ۱۳۳۹ (۱۹۶۰) جدا گردید که بنام **A** قدیم یا **A** شیراز معروف می باشد و در سال ۴۶-۱۳۴۳ تیپ دیگری از تبریز به نام **A** خاورمیانه جدا گردید (۳۰). تیپ **SAT1** اولین بار در سال ۱۳۴۱ در ایران گزارش گردید. این ویروس در سال ۱۳۴۰ به خاورمیانه (فلسطین اشغالی - سوریه و عراق) رخنه نمود و سپس از طاولهای گاوهای مبتلا در کرمانشاه و ایلام جدا گردید و در مناطق غرب کشور شیوع یافت ولی در سال بعد ریشه کن گردید. تیپهای **SAT2 - C** و **SAT3** هیچگاه در ایران دیده نشده اند (۱).

ویروس تب برفکی

۲-۱- دسته بندی

ویروس تب برفکی یکی از ویروسهای خانواده **Picornaviridae** میباشد، این ویروسها کوچک بوده و قادرند در انسان و حیوانات بیماری های مهمی ایجاد نمایند. ویروس تب برفکی به جنس آفتو ویروس (**Aphthovirus**) تعلق دارد، دارای ۲۷-۳۰ نانومتر قطر با ۲۲۰ اسید آمینه و وزن مولکولی ۱۰+۲/۵ دالتون بوده و فاقد غشاء خارجی میباشد. شکل ویروس گرد، ثابت سد یمانتاسیون ویروس **S** ۱۴۰-۱۴۶ و ویروس واجد ژنوم **RNA** تک رشته ای و تک مولکولی با مفهوم مثبت میباشد (۶۰، ۷).

۲-۱-۱- سرو تیپ ها

ویروس تب برفکی توان فوق العاده ای برای تغییرات ژنتیکی از خود نشان می دهد، این ویروس هفت سرو تیپ متفاوت (**A-O-C-SAT1-SAT2-SAT3-Asia1**) دارد. ایمنی بر علیه

یک سروتیپ قادر نیست علیه عفونت با دیگر سروتیپ ها نقش محافظتی داشته باشد، بعلاوه در یک سروتیپ دامنه وسیعی از سویه ها وجود دارند، تاکنون بالغ بر ۸۵ تحت تیپ بر اساس تستهای سرولوژیکی شناسائی شده است (۲،۵۶)

۲-۱-۲- ژنوتیپ ها^۱

هفت سروتیپ تب برفکی در سویه های ژنتیکی جداگانه با اختلاف تقریبی ۳۰ تا ۵۰ درصد در ناحیه **VP1** دسته بندی شدند. این اختلاف را فقط می توان در ناحیه ژن های کپسید دید و توالی سایر ژن ها به این طریق قابل دسته بندی نیست. در یک سروتیپ دامنه وسیعی از سویه ها وجود دارد و تا کنون بیش از ۸۵ تحت تیپ بر اساس آزمایش های سرولوژیکی شناسایی شده است.

۲-۲ - ساختمان شیمیائی ویروس تب برفکی

۱-۲-۲ - ژنوم ویروس تب برفکی

ویروس تب برفکی ویروسی است دارای **RNA** تک رشته ای با مفهوم مثبت ۲ که حدوداً ۸۵۰۰ نوکلئید دارد. **RNA** این ویروس عفونی است چرا که در صورت انتقال **RNA** به سلول، **RNA** قدرت ساخت تمامی پروتئین های لازم برای دوباره سازی ویروس را دارد (۳۸).
ژنوم **FMDV** را می توان به سه قسمت تقسیم نمود.

الف - ناحیه تنظیم کننده غیر ترجمه ای 5' [5 Untranslated Region (5'UTR)]

ب - ناحیه الگوی قرائت شونده [Open Reading Frame) ORF]

ج - ناحیه غیر ترجمه ای 3' [3' Untranslated Region (3'UTR)]

الف - ناحیه تنظیم کننده غیر ترجمه ای 5'

¹-Genotypes

² - Positive sense

این منطقه تقریباً وسیع بوده و حدوداً ۱۰٪ ژنوم ویروس را شامل می‌شود. این ناحیه حدوداً ۱۳۰۰ نوکلئوتید دارد. (۴۸).

الف-۱) VPg (viral protein, genome linked) (پروتئین VPg)

ویروس تب برفکی نظیر سایر پیکورنا ویروس‌ها فاقد کلاهی ۷- متیل گوانوزین (7-methyl-G Cap) در انتهای 5' ژنوم خود می‌باشد. این کلاهی سبب تسهیل تشکیل یک مجتمع پایدار در تحت واحد S ۴۰ ریبوزوم می‌گردد که برای شروع ترجمه لازم است (۴۵).

الف-۲) قطعه S , Poly(c) , PKs

در انتهای 5' ژنوم (5'UTR) یک قطعه S وجود دارد. (شکل ۱)
متعاقب قطعه S قطعه ای دیگر قرار دارد که Poly(c) نام دارد. طول این ناحیه متغیر است (بیش از ۳۰۰-۱۰۰ نوکلئیک)، ساختار این قطعه فوق العاده محافظت شده می‌باشد. طول این قطعه ممکن است با پاتوزنیسیته ویروس مرتبط باشد یعنی اینکه ویروسی که طول Poly(c) بیشتری داشته باشد، حدت بیشتری خواهد داشت (۴۹).

الف-۳) منطقه Pseudoknots (pks)

پس از Poly(c) منطقه دیگری بنام PKs وجود دارد که هنوز عملکرد آن بطور کامل معلوم نشده است.

الف-۴) قطعه International Ribosome Entry Site (IRES)

چون پیکورنا ویروس‌ها فاقد کلاهی می‌باشند می‌بایست دارای تشکیلاتی باشند که بتواند بعنوان آغازگر ترجمه mRNA عمل نماید. این ناحیه حدوداً ۴۴۰ نوکلئوتید دارد (۴۸، ۵۶).

ب: ناحیه الگوی قرائت شونده (Open Reading Frame (ORF)

¹ - Poly Ribocytilate

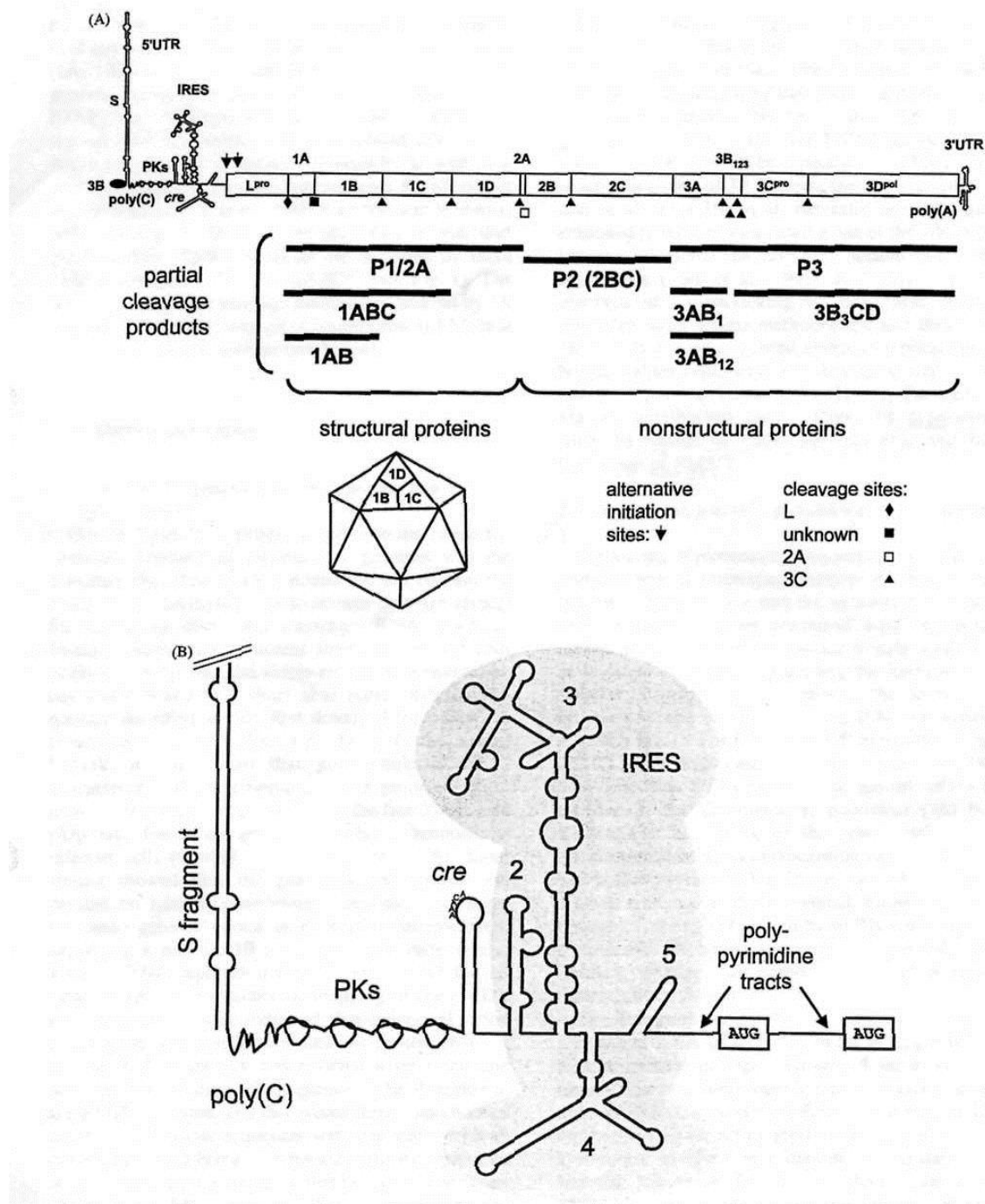
² - Highly conserved

ردیف اسیدهای نوکلئیک مابین کدون های شروع کننده تا کدون پایان دهنده می باشد. این منطقه بشکل یکپارچه قادر است یک پلی پروتئین را کد نماید که پس از ساخته شدن بوسیله پروتئازهای ویروسی شکسته می شود (۴۸، ۴۹)

ج- ناحیه غیرترجمه ای 3'

پس از قطعه 3Dpol ناحیه ORF ژنوم تب برفکی ردیف کوتاه پلی آدنیلاته قرار دارد که به نام ناحیه Poly(A)^۱ خوانده می شود (۴۸)

¹ - Poly Adenylated



شکل ۲-۲-۱- نمای شماتیک ژنوم ویروس تب برفکی (۴۸)

۲-۲-۲- کپسید ویروس تب برفکی:

ویروس تب برفکی دارای کپسیدی با تقارن بیست وجهی ۱ با شعاع ۱۵۰-۱۰۰ آنگستروم و ۶۰ نسخه از چهار پروتئین ساختمانی به نام **Vp1-Vp2-Vp3-Vp4** می باشد. مجموعه این چهار پروتئین یک پروتومر یا واحد ساختمانی کپسید را می سازد، از اتصال پنج پروتومر یک پنتامر ۲ و از اتصال ۱۲ پنتامر ۶۰ نسخه کپسیدی حاصل می شود (۷۲، ۳۲). سطح پروتئین های کپسیدی در بوجود آمدن یک ساختار هشت رشته ای استوانه ای β (بتا) **Beta barrel** مشارکت دارند (۵۶).

۲-۲-۳- آنتی ژن های ویروسی:

۲-۳-۱- پروتئین **Vp1**:

ثابت شده که پروتئین **Vp1** خالص شده و یا مناطقی از **Vp1** که به روش های آنزیماتیک بدست آمده قادرند آنتی بادی خنثی کننده برعلیه ویروس را تولید کرده و سبب مصونیت در گاو و خوک شوند (۱۵).

۲-۳-۲- پروتئین **Vp2**:

پروتئینی است با ۲۱۸ اسید آمینه، منطقه **1C** از ژنوم ویروس مسئول صدور رمز برای این پروتئین است. این پروتئین به تنهایی قادر به تولید آنتی بادی خنثی کننده نیست (۲، ۶۰).

۲-۳-۳- پروتئین **Vp3**:

ناحیه **1B** از ژنوم **FMDV** برای تولید این پروتئین رمز صادر می کند، این پروتئین حدوداً ۲۲۰ اسید آمینه دارد و به تنهایی قادر به تولید آنتی بادی خنثی کننده نیست. اسیدهای آمینه ۱۴۷ و ۱۴۸ پروتئین **Vp3** منطقه چهارم آنتی ژنتیک می باشد (۶۰).

¹ - Icosahedral

² - Pentamer

غیر از منطقه یک لوپ **G-H** پروتئین **Vp1** چهار منطقه آنتی ژنیک دیگر برای سروتیپ **O1** ویروس تب برفکی نام می برند.

۲-۳-۴- پروتئین **Vp4**:

VP4 ساختمانی شبیه **N** انتهایی پروتئین های **VP3-VP1** دارد. این پروتئین برخلاف سه پروتئین ساختمانی **VP2-VP1** و **VP3** یک پروتئین داخلی **internal** می باشد و در جنس های مختلف پیکورناویروس ها اندازه های متفاوت دارد (۵۸).

۲-۲-۴- پروتئین های غیر ساختمانی:

۲-۴-۱- **2A/B/C**

ناحیه **2A-B-C** ژنوم مسئول صدور رمز برای قسمت **P2** پلی پروتئین پیکورناویروس ها است. این قسمت به سه پروتئین، **2A,2B,2C** تقسیم می شود. (۴۸).

۲-۴-۲- **3A/B**

ویروس تب برفکی بخاطر داشتن پروتئین **3A** بزرگتر (۷۸ اسید آمینه در برابر ۵۵ اسید آمینه) و نیز داشتن سه کپی از پروتئین **3B** از سایر پیکورناویروس ها متمایز است. (۴۸).

۲-۴-۳- **3C Proteinase**

این پروتئین یکی از مهمترین پروتئین هایی است که نقش پروتئینازی دارد و در تقسیم پلی پروتئین بزرگ **FMDV** نقش ایفا می کند (۴۸).

گسترش ، بقاء و نشانی های بالینی بیماری تب برفکی:

۳-۲- انتقال:

۳-۲-۱- انتقال مستقیم و غیرمستقیم:

مهمترین راه انتقال مستقیم از راه زخم‌ها، ارزیون‌ها یا از راه مخاطی است. (۱۸، ۳۵)

۳-۲-۲- انتقال از راه هوا (Airborn transmission):

۳-۳-۲- انتقال از راه گوارش (Transmission by the oral route)

این انتقال در کشورهای پاک از اهمیت بیشتری برخوردار است (۱۸).

۳-۳-۴- سایر راه‌ها:

شیر و اسپرم حیوانات آلوده ممکن است حاوی ویروس تب برفکی باشد. احتمال انتقال ویروس تب برفکی در دوران ویرومی در بالاترین حد خود می‌باشد. در زمان بروز نشانی‌های بالینی عیار ویروس ۱۰۶ ذره عفونی در هر میلی‌لیتر شیر ۱۰۶/۲ ذره عفونی در هر میلی‌لیتر منی ۱۰۴/۹ ذره عفونی در هر میلی‌لیتر ادرار و ۱۰۵ ذره عفونی در یک گرم مدفوع می‌باشد (۱، ۴۱).

۳-۴-۲- بقاء ویروس تب برفکی:

مهمترین عامل بقاء ویروس تب برفکی، آلودگی گاوها می‌باشد (۶۱).

این ویروس نسبت به اسیدها و قلیاها حساس است و ترکیبات اسیدی که pH پائین‌تر از ۶/۵ دارند. ضد عفونی کننده‌های خوبی محسوب می‌شوند. (۱۸). ویروس تب برفکی به وسیله هیدروکسید سدیم ۲٪، کربنات سدیم ۴٪ و اسید سیتریک ۲/۰٪ غیرفعال می‌شود (۳۶).

۳-۵- نشانی‌های بالینی

۳-۵-۱- نشانی‌های بالینی در گاو:

دوره کمون بیماری بین ۲ تا ۱۴ روز متغیر است. تب برفکی بیماری تب‌دار حاد (C ۴۱-۴۰) است که همراه با ایجاد تاول‌های بافت پوششی و کاهش شیر در گاوهای شیری بوده و ایجاد بیحالی، ضعف و بی‌اشتهایی می‌نماید. یک تا سه روز پس از ایجاد تب اولیه ویروسی از راه جریان

خون و یا ماکروفاژها به نقاط ثانویه تکثیر خود می‌رود و سبب ایجاد تاول‌هایی در روی زبان، کام سخت، بالشتک دندانی^۱، لب، لثه، پوزه، تاج سم و فضای بین انگشتی می‌شود (۶، ۱). در گاوهای شیری جراحات پستانی ایجاد شده سقط جنین در اثر تب ممکن است ایجاد گردد. قدرت باروری گاوها کاهش یافته و نازایی بعدی از عوارض بیماری می‌باشد (۶، ۱۴، ۱۸). در گوساله‌های تا ۶ ماه ممکن است به دلیل تمایل ویروس به تهاجم و تخریب سلولهای در حال رشد و تکامل قلب (به هنگام بروز واگیری) بر اثر ابتلا به میوکاردیت تلف شوند (۴۵).

۲-۵-۲- نشانی‌های بالینی در گوسفند

بیماری در گوسفند و بز و نشخوارکنندگان وحشی معمولاً خفیف تر از گاوبروز کرده و با زخم شدن سم و لنگش مشخص می‌گردد (۱۴). لنگش در نشخوارکنندگان کوچک اغلب ممکن است با سایر بیماریهایی که سم را درگیر می‌کند اشتباه شود (۴۹).

۲-۶-۱- ایمنی و حاملین در بیماری تب برفکی

۲-۶-۱- ایمنی در تب برفکی:

اولین آنتی‌بادی ایجاد شده بر علیه ویروس تب برفکی **IgM** می‌باشد که چهار روز پس از آلودگی قابل تشخیص بوده، پس از ۱۴-۷ روز به اوج خود رسیده، و پس از ۳۰ روز کاهش می‌یابد. آنتی‌بادی‌های **IgM** اولیه تیپ هومولوگ ویروس را خنثی کرده و گاهی نیز علیه تیپ هترولوگ مؤثرند. **IgM** پایداری زیادی ندارد (۳۵، ۵۶، ۳۳، ۱۸).

بدنبال یک عفونت و یا متعاقب واکسیناسیون سلولهای لنفوسیت **B** شروع به تزايد کرده و با واسطه سلولهای **T** کمکی (CD_4^+) ایجاد پاسخ اختصاصی می‌نماید.

ترشح آنتی‌بادی **IgG** از روز ۱۴-۱۰ پس از آلودگی شروع شده و پس از حدوداً ۲۸ روز به اوج می‌رسد. تولید آنتی‌بادی در دوران نقاهت بیماری قادر به خنثی کردن تیپ‌های ویروسی بطور اختصاصی است و تا حدی هم بر علیه تحت تیپ‌ها مؤثر است. این آنتی‌بادی توانایی ثبوت

¹ - Dental pad

عناصر مکمل را دارد. بنظر می‌رسد پاسخ ایمنی **IgG1** و بیشتر از **IgG2** باشد. **IgG** تا چندین ماه پس از عفونت در سطح بالایی باقی می‌ماند و تا سال ها نیز قابل ردیابی است. بدین خاطر گاوها پس از بهبودی بیش از یکسال و شاید حداکثر ۴/۵ سال در برابر همان تیپ از ویروس که به آن آلوده شده‌اند مقاومند، اما این ایمنی مادام العمر نیست (۴۶،۵۰).

آنتی بادی موجود در گردش خون قدرت این را دارد که با ویرون تشکیل کمپلکس ایمنی دهد و سبب تسهیل در اپسونیزاسیون^۱ شده و از این راه توسط سلولهای ایمنی در طحال، کبد و سایر نقاط فاگوسیتته شوند و از بین بروند (۱۸). آنتی بادی های ترشحی بیشتر **IgM** و بمیزان کمتری **IgA** می‌باشد، **IgG** از سرم منشأ می‌گیرد، در دستگاه‌های گوارشی و تنفسی در اوایل عفونت و یا متعاقب واکسیناسیون قابل ردیابی است (۱۸). در روز ۳۵ بعد از عفونت میزان **IgA** ترشحی به اوج خود می‌رسد. فعالیت خنثی کنندگی ویروس در مایعات حلقی در روزهای ۶۰-۳۰ بیشتر در اثر **IgA** ترشح شده از مخاطات می‌باشد تا تراوش ایمونوگلوبولین‌های سرمی، وقتی حیوان واکسینه شده‌ای در معرض عفونت قرار می‌گیرد، پاسخ ترشحی اولیه آن عاری از **IgM** بوده و به نسبت حیوان غیرواکسینه سطح سرمی و ترشحی **IgG** سریعتر افزایش می‌یابد.

اثرات خنثی کنندگی ویروس در سرم و در مایعات حلقی مری^۲ در گاوهای حامل ویروس به نسبت گاوهای غیرحامل بیشتر خواهد بود. چرا که عفونت پایدار موجب برانگیختن ایمنی مخاطی و هومورال می‌گردد. ایمنی سلولی با واسطه سلولهای **T** سیتوتوکسیک در پاسخ ایمنی به ویروس تب برفکی دخالت ندارند (۴۹). در بحث ایمنی مادری، گوساله‌هایی که به دنیا می‌آیند تا ۶ هفته تیترا سرمی حفاظت کننده دارند و ممکن است تا ۶ ماه این ایمنی با واکسیناسیون تداخل داشته باشد. شروع تزریق واکسن در گوساله می‌بایست با در نظر گرفتن خطر ایجاد خلأ ایمنی مادری پیشنهاد گردد، در سن ۴-۵ ماهگی که پادتن مادری رو به کاهش می‌گذارد واکسن تزریق و یک ماه بعد واکسن یادآور تزریق گردد. البته شواهدی وجود دارد که نحوه پاسخ ایمنی در گوساله‌ها

¹ - Opsonization

² - Oesophageal pharyngeal

به خوبی دامهای بالغ نمی باشد. در گاو حداکثر عیار پاسخ ایمنی در روزهای ۲۱ تا ۲۸ پس از واکسیناسیون به اوج می‌رسد و سپس ممکن است کاهش یابد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد، در دامهای بالغ برای حفظ سطح قابل قبولی از آنتی بادی‌ها هر ۴-۶ ماه یکبار واکسیناسیون انجام گیرد. در صورت استفاده از واکسنهای روغنی در گاو برنامه واکسیناسیون را می‌توان از سال دوم بطور سالیانه تکرار نمود (۶، ۶۱).

تحقیقات نشان داده که انترفرون آلفا و بتا در کنترل گسترش عفونت **FMDV** نقش دارند. همچنین اندازه پلاک ایجاد شده در کشت سلولی را وابسته به میزان انترفرن می‌دانند. انترفرون در روزهای ۲ تا ۶ پس از عفونت یعنی در مرحله حاد بیماری در ترشحات بینی دام قابل شناسایی است (۱۸).

۲-۶-۲- حاملین:

طبق تعریف به حیواناتی حامل گفته می‌شود که بتوان ۲۸ روز پس از عفونت، ویروس را از مایع دهانی حلقی (**OP - Oesophageal- pharyngeal Fluid**) آنها جدا نمود. این وضعیت یک عفونت پنهان پایدار است که جداسازی متناوب ویروس تنها راه شناسایی آن می‌باشد. وقوع چنین حالتی بنظر می‌رسد در دامهای واکسینه مواجه شده با ویروس متداولتر باشد (۵۷).

۲-۷- کنترل بیماری تب برفکی

یکی از راههای مهم جلوگیری و کنترل بیماری "واکسیناسیون منظم" است. البته واکسیناسیون در مواقع خطر هم در کشورهایی که از بیماری عاری هستند به طور اضطراری و هم در کشورهایی که هدف ریشه‌کنی بیماری را دارند اجرا می‌گردد.

۲-۷-۱- انواع واکسن‌ها

واکسن‌های تب برفکی به سه گروه غیر فعال، تخفیف حدت یافته و نسل جدید یا نو ترکیب تقسیم می‌شوند.

۲-۷-۱-۱- واکسن‌های غیر فعال

واکسن‌های این گروه از عمده‌ترین واکسن‌های متداول در سطح جهان جهت مبارزه با تب برفکی محسوب می‌شوند (۶۴) این واکسن‌ها معمولاً دارای دو یا سه تیپ ویروس تب برفکی بوده و گاهی نیز فقط دارای یک تیپ هستند که به آن‌ها به ترتیب یک یا دو یا سه ظرفیتی گفته می‌شود. چون بین تیپ‌ها و تحت تیپ‌ها به دنبال واکسیناسیون ایمنی متقاطع ایجاد نمی‌شود لازم است که در هر منطقه از واکسن‌های خاص ضد سویه‌های موجود در همان منطقه استفاده شود. (۷)

۲-۷-۱-۲- واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته

با توجه به کوتاه بودن دوره ایمنی حاصل از واکسن‌های غیر فعال، استفاده از واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته مورد توجه قرار گرفت. ولی به دلیل نزدیک بودن فاصله از بین رفتن قدرت بیماری‌زایی و ایمنی‌زایی در ویروس با مشکلات عدیده‌ای در مصرف همراه است و به همین جهت می‌بایست کاملاً کنترل شده مورد مصرف قرار گیر (۲۵).

۲-۷-۱-۳- واکسن‌های نسل جدید یا نو ترکیب

علاوه بر تولید واکسن‌های رایج، تحقیقات زیادی برای ساخت واکسن‌های جدید برای بیماری تب برفکی انجام پذیرفته است. پیشرفت علوم مولکولی اطلاعات زیادی در خصوص ساختار ژنوم و آنتی‌ژن ویروس تب برفکی در اختیار محققین قرار داده است. این اطلاعات سبب

شده تا تلاش‌هایی برای ساخت واکسن‌هایی بر پایه پروتئین‌ها و پپتیدهای ویروس تب برفکی و یا DNA واکسن‌هایی که بر پایه کلون کردن ژن کامل و یا ژن مسئول ساخت پروتئین‌های ساختمانی P1 یا ژن مسئول پروتئین VP1 (1D) استوار است، انجام بگیرد. این واکسن‌ها به طور مختصر در زیر آمده است (۲۸).

الف - واکسن تحت واحدی^۱

این واکسن‌ها شامل آنتی‌ژن‌های ویروس ساخته شده از اسید نوکلئیک توسط روش‌های شیمیایی یا روش‌های بیان بیولوژی بوده و حاوی حد اقل یک آنتی‌ژن ویروس می‌باشد.

ب - واکسن‌های وکتورهای زنده^۲

به ویروس‌های تضعیف شده با مواد شیمی که به عنوان وکتورهای انتقال ژن‌ها استفاده می‌شود، گفته می‌شود (۶۳، ۶۴)

ج - واکسن‌های اسید نوکلئیک^۳

این واکسن‌ها از مهندسی DNA جهت تولید پاسخ ایمنی حیوانات ناشی از تزریق آن‌ها به دست آمده است (۶۴).

د - واکسن‌های جدید ضعیف‌شده^۴

¹ subunit vaccine

² live vector vaccine

³ Nucleic acid vaccines

⁴ Novel attenuated vaccine

این واکسن‌ها از ویروس‌های ضعیف شده توسط حذف قسمت‌های واگیری یا مسئول تکثیر ویروس تولید می‌شوند. در ویروس تب برفکی به طور مثال حذف قسمت مسئول اتصال ویروس به سلول یا جایگزین آن استفاده شده است. (۶۴،۵۳)

ه - واکسن‌های پپتیدی ساخته شده^۱

در این نوع واکسن‌ها از پپتیدهای حاوی اپی‌توپ‌های (اپی‌توپ قسمت از پروتئین یا آنتی ژن که توسط سیستم ایمنی تشخیص داده می‌شود و برعلیه آن آنتی بادی ساخته می‌شود) ویروس به شکل مصنوعی با روش‌های شیمیایی استفاده می‌شود که در مورد ویروس تب برفکی لوپ GH ژن VP1 مهمترین قسمت برای تولید این نوع واکسن‌ها می‌باشد.

۲-۸- تشخیص:

تشخیص اولیه بیماری بر اساس علائم بالینی و با توجه به تاریخچه تماس بین گله و حیوانات آلوده، اپیدمیولوژی بیماری در منطقه و گزارش از وقوع تب برفکی در نزدیکی محل استوار است (۶۱، ۶۲، ۴۵). بطور کلی تست‌های آزمایشگاهی جهت تشخیص ویروس تب برفکی به دو گروه کلی تقسیم می‌شوند.

الف- روش‌های شناسایی عامل بیماری (ویروس)

ب- آزمایشهای سرولوژیکی

الف- روش‌های شناسایی عامل بیماری عبارتند از:

۱- جداسازی ویروس Virus Isolation، با استفاده از کشت سلولی یا حیوانات

آزمایشگاهی

۲- روش‌های ایمنی شناسی، شناسایی عامل شامل:

¹ Synthetic peptide vaccine

2-1) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

2-2) Complement Fixation test (CFI)

۳- روش‌های شناسایی اسیدنوکلئیک Nucleic acid recognition methods

Real Time-PCR و RT-PCR نظیر

ب- آزمایش‌های سرولوژیکی Serological Tests

آزمایش‌های خنثی‌سازی ویروس

1) Virus Neutralization (VN)

2) Nonstructural protein antibody test (VIA)

3) Liquid- phase blocking enzyme- linked immunosorbent assay

در صورت وجود ویروس کافی در نمونه و دسترسی به مواد لازم می‌توان سروتیپ ویروس تب برفکی موجود در بافت‌ها یا مایعات تاولی از دامهای مشکوک را تعیین نمود (۲۳). تشخیص مطمئن FMDV باید در آزمایشگاههای اختصاصی انجام پذیرد (۶۱).

۲-۸-۱- جداسازی ویروس Virus Isolation

برای جداسازی ویروس می‌توان از: الف- کشت سلولی ب- حیوانات آزمایشگاهی

استفاده نمود.

۲-۸-۱-۱- کشت سلولی:

نمونه اپی تلیوم را پس از شستشو و آماده‌سازی می‌توان به کشت سلولی تلقیح نمود

سلولهای نظیر BK (Primary bovine kidney cells) IB-RS-2 (کلیه خوک) یا BHK-

21 (سلول کلیه بچه‌ها مستر)، از حساسیت خوبی نسبت به ویروس تب برفکی برخوردار هستند.

۲-۸-۱-۲- حیوانات آزمایشگاهی:

خوکچه هندی مدلی مناسب برای تحقیقات تب برفکی در آزمایشگاه می‌باشد. ویروس تب برفکی را می‌توان به خوکچه هندی تلقیح نمود و بیماری مشابه آنچه در گاو دیده می‌شود، مشاهده کرد. همچنین از موش شیرخوار ۲-۷ روزه نیز می‌توان جهت جداسازی ویروس استفاده نمود.

۲-۸-۱-۳- آزمایش الیزا:

برای تشخیص نمونه‌ها از کیت تهیه شده توسط انستیتو بهداشت دام آزمایشگاه پیربرایت (Institute for Animal Health Pirbright Laboratory) استفاده می‌شود.

۳- مواد و روش ها:

۳-۱- انتخاب نمونه و نمونه برداری:

تب برفکی در لیست A دفتر مبارزه با بیماریهای واگیر دام OIE قرار دارد. تمامی دامپزشکان شاغل در بخش دولتی و خصوصی موظف به گزارش وقوع تب برفکی در صورت مشاهده علائم می باشند. لذا از دامهای مشکوک به بیماری نمونه تهیه می گردد و به دامپزشکی استان ارسال می شود. در این بررسی ضایعات لثه و زبان و در برخی از موارد ضایعات بر روی تاج سم توسط دامپزشکان اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی از دامهای مشکوک اخذ و داخل تامپون مخصوص به آزمایشگاه ارسال و تا موقع انجام مراحل آزمایشگاهی در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۳-۲- آماده سازی اولیه نمونه برای آزمایش های الیزا و کشت سلولی

جهت آماده سازی نمونه در ابتدا حدوداً ۵۰۰ میلی گرم از نمونه در هاون چینی سرد با بافر فسفات سرد شستشو شد تا گلیسرول آن حذف گردد و سپس با ۴/۵ میلی لیتر بافر فسفات سرد هموژن گردید. این مرحله برای جلوگیری از آلودگی در زیر هود کلاس II انجام گرفت. سپس تعلیق به دست آمده به لوله های آزمایش و یا میکروتیوب های اپندروف ۱/۵ میلی لیتری منتقل و با شرایط ۳ هزار دور بمدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. مایه روئی یا

بلافاصله برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت و یا تا انجام آزمایش داخل فریزر ۲۰- نگهداری گردید.

۳-۳- آزمایش جداسازی ویروس (کشت سلولی):

جهت جداسازی ویروس از سلول کلیه خوک **IB-RS-2** که سلول لاین با قدرت پاساژ مکرر می- باشد (**Contentious Cell Line**) استفاده گردید. این سلول از بخش تب برفکی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید.

۳-۳-۱- آماده سازی سلول :

برای تکثیر و آماده سازی سلول ، سلولهایی که بشکل یخ زده داخل کرایو تیوب های مخصوص در تانک ازت حاوی ازت مایع نگهداری می شوند، خارج و بلافاصله داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل می گردد تا یخ سلول ها باز گردد. پس از آن محتویات کرایو تیوب داخل ۵ تا ۷ میلی لیتر محیط (**DMEM +10% FCS**) حاوی ۱۰-۵ درصد سرم جنین گوساله (**Fetal Calf Serum**) انتقال یافته و سپس به داخل فلاسک ۵۰ میلی لیتری مخصوص کشت سلولی منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد دارای ۵ درصد **CO2** نگهداری می گردد. پس از طی ۴۸ ساعت و در مواردی ۷۲ ساعت (بستگی به میزان رشد و تطابق سلول با محیط دارد) با تخلیه مایع روئی سلول ها اقدام به پاساژ و تکثیر سلول ها می گردد .

پاساژ سلول ها بطور مختصر به قرار زیر می باشد.

۱- خارج نمودن محیط کشت

۲- افزودن تریپسین (۰.۲/۵٪ وزنی حجمی)

۳- خارج نمودن تریپسین در کمتر از چند دقیقه

۴- قرار دادن در ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۳ تا ۵ دقیقه

۵- افزودن ۵ میلی لیتر محیط استوک

۶- جداسازی سلول ها با عمل پیپتینگ مکرر

۷- شمارش سلولی با هموسیتومتر و رنگ تریپان بلو

۸- انتقال تعداد مناسبی از سلول‌ها به فلاسک کشت سلولی موردنظر

۹- قراردادن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO₂ رعایت شرایط انتقال

۱۰- بررسی رشد سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس

۳-۲- آماده سازی نمونه‌ها:

آماده‌سازی نمونه‌ها طبق آنچه آورده شده تا مرحله سانتریفوژ انجام گرفت و سپس مایع بالایی برداشت و با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون (Millipore 0.22μm) فیلتر گردید.

۳-۳- تلقیح نمونه‌ها:

در ابتدا فلاسک‌های حاوی سلول از انکوباتور خارج شد و سپس در کنار شعله و زیر هود لامینار محیط رویی سلول‌ها خارج گردید و مقدار ۰/۵ تا یک میلی‌لیتر از نمونه آماده شده به آن افزوده شده و پس از یک‌نواخت‌سازی به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، تا عمل جذب ویروس انجام پذیرد. طی این مدت هر ۱۰ دقیقه فلاسک موردنظر به آرامی تکان داده می‌شود. آنگاه بعد از دور ریختن مایع تلقیح شده سلول‌ها با ۳ تا ۵ میلی‌لیتر محیط ارل (رجوع شود به پیوست) ساخت موسسه رازی به آرامی شستشو می‌گردد و سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر محیط نگهداری ارل به آن افزوده و در انکوباتور قرار داده می‌شود. بعد از ۱۰ تا ۱۵ ساعت هر چند ساعت یک‌بار توسط میکروسکوپ معکوس (Invert) مورد بررسی قرار می‌گیرد تا CPE مشاهده شود. مدت زمان انکوباسیون برای کنترل سلول‌های تلقیح شده (دیدن CPE) برای هر یک از پاساژها ۴۸ ساعت می‌باشد. نمونه‌های منفی تا سه پاساژ کشت داده می‌شوند.

۳-۴- آزمایش الیزا:

پس از آماده سازی نمونه های مشکوک طبق آنچه در آماده سازی نمونه توضیح داده شد و نیز آماده سازی بافرها و آنتی سرم ها طبق دستورالعمل کیت مراحل انجام آزمایش به قرار زیر می باشد:

ردیابی آنتی ژن سویه های **O , A , Asia 1 , C , Pan** تب بر فکی در نمونه های مرضی (وزیکول های اپیتلیومی و مایع زیکولی) به روش الیزا با کیت **IZSLER** انجام گرفت.

۳-۴-۱- روش آماده سازی محلول های همراه کیت:

۳-۴-۱-۱- کونژوگه **Pan -FMDV HRPO**: به نسبت ۱:۱۰ با محلول بافر رقیق می گردد.

محلول کونژوگه به صورت تازه تهیه گردیده و حداقل حجم مورد نیاز هر روز آماده و مصرف می شود.

۳-۴-۱-۲- **تهیه محلول شستشو**: محلول شستشو با غلظت $10 \times$ را با آب مقطر به رقت $1 \times$ رسانده شده. در صورت کریستالیزه شدن قبل از استفاده آن را گرم نموده (البته در دمای آزمایشگاه قرارداداده تا از حالت کریستال خارج گردد) و خوب هم زده می شود تا کاملاً حل گردد. بهتر است محلول شستشو به صورت تازه تهیه و مصرف شود. ولی میتوان محلول شستشو رقیق شده را برای مدت یک ماه در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳-۴-۱-۳- **آماده سازی نمونه**: نمونه ها را به نسبت ۱:۲ با بافر رقیق کننده رقیق نموده و در ۱۲ چاهک و در هر چاهک مقدار $50 \mu L$ ریخته شود. در هر میکروپلیت الیزا می توان ۶ نمونه را تست کرد.

۳-۴-۲- روش آزمایش:

- $50 \mu\text{L}$ از الیزا بافر را به تمام چاهک های ردیفهای **G** و **H** اضافه می نماییم. (ردیف **G** برای کنترل مثبت و ردیف **H** برای کنترل منفی در نظر گرفته می شود.)
- $50 \mu\text{L}$ از هر نمونه آماده شده در ۱۲ چاهک هر ردیف ریخته می شود.
- پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه (۱۸-۳۰ درجه سانتی گراد) قرار داده می شود.
- پلیت به سرعت خالی شده و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو رقیق شده را به هریک از چاهک ها اضافه و ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه می نماییم. پس از این مدت زمان، چاهک ها را خالی می کنیم. این عمل شست و شو را ۲ بار دیگر تکرار می کنیم (مجموعاً ۳ بار).
- با ضربه زدن پلیت روی کاغذ جاذب تمیز مایعات باقی مانده را از پلیت خارج می نماییم.
- $50 \mu\text{L}$ کونژوگه رقیق شده به همه چاهکها اضافه گردد. بعد از پوشاندن پلیت آن را برای ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار می دهیم.
- مرحله شستشو بعد از سپری شده زمان انکوباسیون در سه مرحله مانند قبل انجام شده و در مرحله چهارم ۵ دقیقه انکوبه می شود، سپس پلیت خالی شده و خشک می گردد.
- $50 \mu\text{L}$ از محلول سوبسترا /کروموژن آماده مصرف به تمام چاهک ها اضافه می گردد.
- پلیت را پوشانده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در تاریکی انکوبه می نماییم (بعد از ریختن محلول در اولین چاهک زمان را یادداشت می گردد).
- $50 \mu\text{L}$ از محلول **STOP** به همه چاهک ها اضافه می کنیم.
- باید بلافاصله پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شود.

۳-۴-۳-تفسیر نتایج (Interpretation)

Validation Criteria –

OD کنترل مثبت باید مساوی ۱ یا بالاتر در نوع واکنش های خاص و واکنش

Pan- FMDV باشد. **OD** کنترل منفی باید کمتر از ۰/۱ در تمام چاهک های مخصوص کنترل منفی باشد. اگر **OD** نمونه ها برای تیپ **O,A,Asia1,C** کمتر از ۰/۱ باشد برای همه تیپ ها منفی هستند.

۳-۴-۴-محاسبه نتایج :

ارزش متوسط **OD** پس از کسر **OD(Blank)** چنانچه ۰/۱ یا بیشتر باشد، نمونه مثبت تلقی می گردد.

۳-۴-۴-۱ اگر **OD** نمونه برای تیپ **O** بیشتر یا مساوی ۰/۱ برای نوع **O MAb** و **Pan- FMDV MAb** باشد، مثبت است. بعضی از نمونه ها واکنش متقاطع با **MAb A 4D12** نشان می دهند اما **OD** برای **MAb O** بالاتر است.

۳-۴-۴-۲ اگر **OD** نمونه ها حداقل در یکی از ۲ نوع **A** و **Pan-FMDV MAb**، بیشتر یا مساوی ۰/۱ باشد، برای نوع **A** مثبت هستند.

۳-۴-۴-۳ اگر **OD** نمونه ها برای تیپ **Asia1** و **Pan-FMDV MAb** بیشتر یا مساوی ۰/۱ باشد، برای نوع **Asia1** مثبت هستند.

۳-۴-۴-۴ اگر **OD** نمونه ها برای تیپ **C** و **Pan-FMDV MAb** بیشتر یا مساوی ۰/۱ باشد برای نوع **C** مثبت است

۳-۴-۴-۵ اگر **OD** نمونه ها در **untyped Pan-FMDV MAb** بیشتر یا مساوی ۰/۱ و کمتر از ۰/۱ برای **type-specific MAbs** باشد، مثبت بدون تایپ هستند.

۳-۵- بررسی مولکولی نمونه‌های ارسالی

۳-۵-۱- آماده‌سازی نمونه:

جهت آماده‌سازی نمونه در ابتدا حدوداً ۵۰۰ میلی گرم از نمونه در هاون چینی بابافرسفات سرد شستشو شده و سپس با ۴/۵ میلی‌لیتر از آب مقطر فاقد **RNase** هموژن گردید. این مرحله برای جلوگیری از آلودگی در زیر هود کلاس II و در بعضی از مواقع کنار شعله انجام گرفت. سپس تعلیق به دست آمده به لوله آزمایش و یا میکروتیوب های اپندروف ۱/۵ میلی‌لیتری فاقد **RNase** (منتقل و داخل یخچال نگهداری و در صورتی که استخراج **RNA** در روزی دیگر انجام می گرفت داخل فریزر ۲۰- نگهداری می‌شد.

۳-۵-۲- استخراج RNA:

بدین منظور از کیت استخراج **RNA** استفاده گردید. **RNA** نمونه ها بر مبنای روش کومنزینسکی^۱ و ساچی^۲ و با استفاده از روش (Gunadinium Thiocyanate- phenol- chloroform) استخراج گردید (۸۴). مراحل استخراج طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت.

۳-۵-۳- انتخاب پرایمر:

جدول ۳-۵-۳- سکانس و موقعیت پرایمرهای استفاده شده برای تعیین تیپ ویروس تب

برفکی برای RT-PCR

Primer	Sequence 5'-3'	Virus	Location
EUR-2B52R	GACATGTCCTCCTGCATCTGGTTGAT	FMDV	2B
NK72 R	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	FMDV	2A/2B
O-1C272F	TBGCRGGNCTYGCCAGTACTAC	FMD-O	VP3
O-1C244F	GCAGCAAAACACATGTCAAACACCTT	FMD-O	VP3
O-1C283F	GCCCAGTACTACACAGTACAG	FMD-O	VP3
A-1C562F	TACCAAATTACACACGGGAA	FMD-A	VP3

¹ - Chomczimski

² - Saachi

A-1C612F	TAGCGCCGGCAAAGACTTTGA	FMD-A	VP3
As1-1C530F	CCACRAGTGTGCARGGATGGGT	FMD-Asia1	VP3
As1-1C613F	GCCGGCAARGAYTTTGAGTTYCG	FMD-Asia1	VP3

۳-۵-۴- واکنش رونوشت برداری معکوس: Reverse Transcription

بدلیل نیاز **cDNA** برای انجام عمل تزاید در واکنش **PCR**، از واکنش **RT** برای ساخت **cDNA** استفاده گردید. برای انجام مرحله **RT** حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد و پس از مخلوط کردن مواد واکنش انجام پذیرفت. اجزاء واکنش در جدول ۷-۶-۴ آورده شده است.

جدول ۳-۵-۴- نام و مقادیر مواد استفاده شده برای واکنش رونوشت برداری معکوس

نام ماده	میزان مورد استفاده
۱- بافر RT (5x RT Buffer) حاوی MgCl₂ 3mM ، KCl 75 mM و Tris-HCl 0 mM در pH = 8/3 و Dithiotherestol 10 mM	۶ میکرولیتر
۲- dNTP (10 mM dNTP Mix) ساخت شرکت Fermentas	غلظت نهائی ۰/۲ میلی مولار
۳- مهارکننده آنزیم RNsae ساخت شرکت Fermentas	۴ واحد (4lu)
۴- پرایمر (Forward)	۲۰ پیکومول
۵- آنزیم M-MULV200 lu/μ ساخت شرکت Fermentas	۳۰۰ واحد (300lu)
۶- آب مقطر فاقد Rnase	۹/۵ میلی لیتر
۷- RNA استخراج شده	۴ میکرولیتر
حجم نهائی	۲۵ میکرولیتر

واکنش **RT** در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه و سپس یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. سپس **cDNA** تهیه شده برای واکنش **PCR** مورد استفاده قرار گرفت. و یا در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد تا متعاقباً مورد استفاده قرار گیرد.

۳-۵-۵- واکنش **PCR**:

پس از انجام **RT** و تهیه **cDNA** واکنش **PCR** به دو منظور استفاده گردید.

الف- تشخیص ویروس تب برفکی

واکنش **PCR** اولیه در حجم ۲۵ میکرولیتر بوده که اجزای واکنش و مقادیر آن به قرار زیر می باشد.

جدول ۳-۵-۵- نام و مقادیر مواد مورد استفاده برای واکنش **PCR**

نام ماده	میزان مورد استفاده
۱- بافر PCR (10x PCR Buffer)	۳/۵ میکرولیتر
۲- کلرومنیزیم MgCl₂ (50Mm)	غلظت نهائی (2 mM)
۳- dNTP (10 mM dNTP Mix) ساخت شرکت Fermentas	غلظت نهائی 0.2mM
۴- آنزیم Taq DNA Polymerase (5IU) ساخت شرکت Fermentas	با غلظت نهائی 0/2 IU
۵- پرایمر (Reverse)	۱۰ پیکومول
۶- پرایمر (Forward)	۱۰ پیکومول
۷- آب مقطر فاقد RNase	۱۵ میکرولیتر

۸-cDNA (بمیزان ۱۰ درصد)	۲/۵ میکرولیتر
حجم نهائی	۲۵ میکرولیتر

بمنظور واکنش حرارتی انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر استفاده گردید.

دستورالعمل سیکل‌های حرارتی استفاده شده در جداول آورده شده است.

جدول ۳-۵-۱- دستورالعمل سیکل حرارتی استفاده شده اول برای واکنش PCR برای

تشخیص ویروس تب برفکی

درجه حرارت و زمان حرارت دادن	تعداد
۱- ۹۵ درجه سانتی گراد ، ۳۰ ثانیه	یک سیکل
۲- ۹۵ درجه سانتی گراد ، ۳۰ ثانیه - ۶۰ درجه سانتیگراد، ۳۰ سیکل ۳۰ ثانیه- ۷۲ درجه سانتیگراد ، ۳۰ ثانیه	۳۰ سیکل
۳- ۷۲ درجه سانتیگراد، ده دقیقه	یک سیکل

جدول ۳-۵-۲- دستورالعمل سیکل حرارتی استفاده شده دوم برای واکنش PCR برای

تشخیص ویروس تب برفکی

درجه حرارت و زمان حرارت دادن	تعداد
۱- ۹۵ درجه سانتی گراد ، ۳۰ ثانیه	یک سیکل
۲- ۹۵ درجه سانتی گراد ، ۳۰ ثانیه - ۶۰ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه- ۷۲ درجه سانتیگراد ، ۳۰ ثانیه	۳۰ سیکل
۳- ۷۲ درجه سانتیگراد، ده دقیقه	یک سیکل

ب- واکنش PCR برای تعیین تیپ ویروس تب برفکی

پس از انجام واکنش اولیه جهت تشخیص ویروس تب برفکی پس از اطمینان از مثبت بودن واکنش برای تعیین تیپ‌های تب برفکی از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. در جدول ۳-۵-۳ نام، موقعیت و توالی اسیدهای نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

واکنش **PCR** در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر طبق آنچه برای تشخیص **FMDV** آورده شده انجام گرفت. برای تعیین تیپ از پرایمرهای تعیین تیپ استفاده گردید.

۳-۵-۶- شناسایی محصول **PCR**

با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۲-۱/۵ درصد وجود یا عدم وجود محصول **PCR** مورد ارزیابی قرار گرفت، بدین منظور برای تهیه ژل از بافر **0.5X-TBE** و یا **1x-TAE** استفاده گردید. و پس از تهیه ژل به میزان ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به آن سایبرسیف **SYBR Safe** افزوده شد. محصول **PCR** به مقدار ۷-۶ میکرولیتر از هر نمونه با ۲ میکرولیتر از بافر رهنما (**6xloading Buffer**) مخلوط و در چاهک ژل قرار می‌گیرد. برای تعیین اندازه باند موردنظر از مقدار ۳ میکرولیتر مارکر **DNA (50 or 100 pb DNA lader)** استفاده می‌گردد.

در پایان ژل موردنظر با **UV Transiluminuter** بررسی گردید.

باند موردنظر برای تعیین تیپ **A**، قطعه ای به طول ۸۶۶ جفت باز و برای پرایمر دوم ۸۱۸ جفت باز برای تیپ **A**، قطعه ای به طول ۱۱۳۵ جفت باز برای استفاده از پرایمر اول ۱۱۶۵ جفت باز برای استفاده از پرایمر دوم و ۱۱۲۴ جفت باز برای استفاده از پرایمر سوم برای تیپ **O** و قطعه ای به طول ۸۸۶۱۳۵ جفت باز برای استفاده از پرایمر اول ۸۰۳ جفت باز برای پرایمر دوم برای تیپ **Asia1** می‌باشد.

۳-۵-۷- خالص سازی و ارسال نمونه برای تعیین توالی اسید نوکلئیک

تعداد ۵ نمونه از ویروس‌های شناسائی شده انتخاب و سپس با استفاده از کیت خالص سازی محصول **High pure PCR product purification PCR** **Kit(Roche/Germany)** طبق دستورالعمل کیت پس از خالص سازی محصول **PCR** و برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به خارج از کشور با واسطه شرکت سینا ژن فرستاده شد.

۳-۶- تشخیص ویروس و تیپ‌های ویروس تب برفکی با استفاده از **Real Time PCR**

۳-۶-۱- آماده سازی نمونه‌ها:

ابتدا نمونه‌های بافتی داخل تامپون ارسالی را با استفاده از **PBS** یا آب مقطر استریل (**Nuclease free** چند بار به دقت شستشو داده سپس بوسیله هاون از نمونه مورد نظر سوسپانسیون ۱۰ درصد تهیه می‌کنیم. (حدود ۲۰۰ میلی گرم از نمونه مورد نظر شامل اپیتلیوم دهان، عقده لنفاوی کبد، طحال، کلیه، قلب و... را برداشته و بوسیله هاون استریل نمونه را کاملاً کوبیده و هموژن می‌کنیم. از محلول رویی نمونه‌های آماده شده جهت استخراج **RNA** استفاده می‌شود. سپس به آن ۱۲۰۰ میکرولیتر **PBS** استریل اضافه کرده و کاملاً هموژن می‌کنیم و داخل میکروتیوب ۲ml منتقل کرده و با دور پایین ۳۰۰۰-۵۰۰ g سانتریفوژ نموده و از محلول رویی جهت استخراج **RNA** استفاده می‌کنیم.

۳-۶-۲- استخراج **RNA**

- ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر (شیرابه تهیه شده بافت) را داخل میکروتیوب ۱/۵ منتقل می‌کنیم.

- مقدار ۳۹۶ میکرولیتر از بافر لیز کننده یا (**Binding buffer**) به نمونه اضافه می‌کنیم.

- محلول **Poly A** را از فریزر خارج کرده و پس از ذوب شدن کامل آن مقدار ۴ میکرولیتر به نمونه و بافر لیز کننده اضافه می‌کنیم.

- سپس با قرار دادن میکروتیوب داخل ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه آن را ورتکس می‌کنیم.

- به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می کنیم تا مرحله لیز سلولی و آزاد سازی RNA کامل می شود.

- فیلتر ستونی را داخل تیوب های نگهدارنده قرار دهید و محلول لیز شده را بوسیله سمپلر داخل آن بریزید و بوسیله سانتریفیوژ با دور **8000g** به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می نماییم.

- محلول خارج شده از فیلترها که حاوی بقایای سلولی و پروتئینها می باشد را همراه تیوب نگهدارنده دور ریخته و فیلتر را که حاوی RNA است به تیوب نگهدارنده جدید منتقل می نماییم.

- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر **Inhibitor-Removal buffer** به فیلتر اضافه می کنیم و دوباره در دور **8000g** به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. تیوب نگهدارنده به همراه محلول موجود در آن را دور ریخته و فیلتر را به تیوب نگهدارنده جدید منتقل می نماییم.

- مقدار ۴۵۰ میکروفیلتر **Wash buffer** به فیلتر اضافه می کنیم و در دور **8000g** به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. تیوب نگهدارنده به همراه محلول موجود در آن را دور ریخته و فیلتر را به تیوب نگهدارنده جدید منتقل می نماییم.

- دوباره مقدار **450** میکروفیلتر **Wash buffer** به فیلتر اضافه می کنیم و در دور **8000g** به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. تیوب نگهدارنده به همراه محلول موجود در آن را دور ریخته و فیلتر را به تیوب نگهدارنده جدید منتقل می نماییم.

- در این مرحله بدون اضافه کردن محلولی آن را در دور بالا (**13000g**) به مدت ده ثانیه خشک می کنیم تا محلولهای باقی مانده در ستون بطور کامل خارج می شوند .

- تیوب نگهدارنده را دور انداخته و فیلتر را در میکروتیوب ۱/۵ درب دار گذاشته ، سپس ۵۰ میکرولیتر **Elution buffer** به فیلتر اضافه کرده و به مدت ۱ دقیقه با سرعت 8000 g سانتریفوژ می کنیم .

- محلول خارج شده در میکروتیوب ۱/۵ حاوی **RNA** می باشد که می توانیم بلافاصله جهت **RT PCR** استفاده کنیم یا برای نگهداری موقت به فریزر منفی ۲۰ و برای نگهداری طولانی مدت به فریزر منفی ۷۰ درجه منتقل می کنیم.

۳-۶-۳ Real Time PCR : در مرحله بعد **RNA** استخراج شده را جهت تشخیص آلودگی به ویروس تب برفکی به روش **Real Time PCR** آزمایش می کنیم .
-در ابتدا جهت شناسایی ویروس ویروس تب برفکی به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی منطقه **3D ژنوم** تب برفکی انجام می گیرد . به روش ذیل :

-پرایمر ها و پروب بصورت محلول کاری ۱۰ پیکومولی تهیه شده است و **Master Mix** های تجاری بصورت **2X** به بازار عرضه می شوند و باید در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شوند.
-ابتدا زیر هود **Clean** اجازه دهید پرایمر و اجزاء کیت کاملاً ذوب شود و سپس بر اساس جدول زیر مستر میکس را تهیه می کنیم. (بر اساس تعداد نمونه با در نظر گرفتن نمونه های کنترل مثبت و منفی مقادیر جدول را در تعداد نمونه ضرب کرده و داخل یک میکروتیوب ۱/۵ مستر میکس تهیه می شود.)

جدول ۳-۶-۱- نوع مواد و میزان مواد مورد استفاده برای تهیه مستر میکس جهت تشخیص

ویروس تب برفکی به روش Real Time PCR

Reagent	Use solution	$\mu\text{l}/1\times$ for 25 μl reaction
HPLC-Water	1	3.5 μl
Ribo Inh	400U/ μl	0.5
Enzyme		0.5
Buffer	2x	12.5
Forward primer	10 μM	1
Reverse primer	10 μM	1
Probe TaqMan	5 μM	1
Master mix		20 μl
Template		5 μl

- پس از تهیه مستر میکس مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن را داخل میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتر مخصوص ریخته و به میکروتیوب کنترل منفی ۵ میکرولیتر RNase-free water اضافه کرده و در آن بسته می شود سپس میکروتیوب ها را به هود مخصوص RNA Template (استخراجی) منتقل کرده و مقدار ۵ میکرولیتر RNA از نمونه ها به میکروتیوب ها اضافه و در مرحله آخر RNA کنترل مثبت را اضافه می نماییم. در روش End point Analysis برای هر بار 3D real time RT-PCR سه نمونه کنترل مثبت و دو نمونه کنترل منفی در نظر گرفته می شود. در میکروتیوب ها را بسته و بوسیله میکروپیوژ ۱۰-۱۵ ثانیه سانتریفیوژ می گردد تا

کاملاً مخلوط شوند و سپس به دستگاه **Real Time PCR** منتقل کرده و پروتکل دمایی زیر اجرا می شود.

جدول ۳-۶-۲- سیکل های حرارتی استفاده شده برای تشخیص ویروس تب برفکی به

روش **Real Time PCR**

Real Time RT-PCR cyler conditions			
Step	Time	Temperature	Cycle
Reverse transcription	30 min	60°C	1
PCR initial activation step	10 min	95°C	1
Denaturation	30 Sec	94°C	45
Annealing and	60 Sec	60°C	
Elongation*			

***Collect fluorescent data using FAM filters**

پس از اتمام آزمایش نتیجه را با استفاده از نرم افزار دستگاه و آنالیز در کانال **Fam** بررسی و اعلام نتیجه را گزارش می کنیم.

۳-۶-۴- تشخیص تیپ های ویروس به روش **Multiplex Real Time PCR**

نمونه های مثبت را جهت تایپینگ به روش **Multiplex Real Time PCR** آزمایش می کنیم . در این روش هر سه سرو تایپ **A,O,Asia** به طور همزمان و توسط پروبهای با رنگهای مختلف قابل تشخیص می باشد بصورتیکه به کانال **Fam** برای خوانش تیپ **O**، کانال **yellow** برای تیپ **A** و کانال **Red** برای تیپ **Asia1** استفاده می شود .مراحل آزمایش به قرار ذیل می باشد:

-ابتدا زیر هود **Clean** اجازه دهید پرایمر و پروب و مستر میکس کاملاً ذوب شود .

- سپس بر اساس جدول زیر مستر میکس را تهیه می کنیم. (بر اساس تعداد نمونه با در نظر گرفتن نمونه های کنترل مثبت و منفی مقادیر جدول را در تعداد نمونه ضرب کرده و داخل یک میکروتیوب ۱/۵ مستر میکس تهیه می شود)

جدول ۳-۴-۱- نوع مواد و میزان مواد مورد استفاده برای تهیه مستر میکس جهت

تشخیص تیپ های ویروس تب برفکی به روش Real Time PCR

Reagent	Use solution	$\mu\text{l}/1\times$ for 25 μl reaction
HPLC-Water	1	0.75 μl
Ribo Inh	400U/ μl	0.5
MgSo4	50mM	1.5
Enzyme		1
Buffer	2x	12.5
Master As1 (primer R&F,probe)	8 μM	1.25
Master O (primer R&F,probe)	8 μM	1.25
Master A (primer R&F,probe)	8 μM	1.25
Master mix		20 μl
Template		5 μl

-پس از تهیه مستر میکس مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن را داخل میکروتیوب های ۰/۲ مخصوص

Real Time PCR ریخته و به میکروتیوب کنترل منفی ۵ میکرولیتر **RNase-free water**

اضافه کرده و در آن را ببندید سپس میکروتیوب ها را به هود مخصوص اضافه کردن

RNA)Template (استخراجی) منتقل کرده و مقدار ۵ میکرولیتر **RNA** از نمونه ها به

میکروتیوب ها اضافه نمایید و در مرحله آخر **RNA** کنترل مثبت را اضافه نمایید. در روش **End**

point Analysis برای هر بار **Multiplex real time RT-PCR** سه نمونه کنترل مثبت و دو نمونه کنترل منفی در نظر بگیرید . در میکروتیوب ها را بسته و بوسیله میکروپیوژ ۱۰-۱۵ ثانیه سانتریفیوژ نمایید تا کاملاً مخلوط شوند و سپس به دستگاه **Real Time PCR** منتقل کرده و پروتکل دمایی زیر را اجرا کنید.

جدول ۳-۶-۴-۲- سیکل های حرارتی استفاده شده برای تشخیص تیپ های ویروس تب

برفکی به روش **Real Time PCR**

Real Time RT-PCR cyciler conditions			
Step	Time	Temperature	Cycle
Reverse transcription	30 min	60°C	1
PCR initial activation step	10 min	95°C	1
Denaturation	30 Sec	94°C	45
Annealing and	60 Sec	60°C	
Elongation*			

***Collect fluorescent data using FAM, Yellow, Red filters**

-تفسیر نتایج : پس از اتمام آزمایش نتیجه را با استفاده از نرم افزار دستگاه و آنالیز در کانال **Fam, Yellow, Red** بررسی و نتیجه را اعلام می کنیم. (کانال **Fam** برای تیپ **O**، کانال **yellow** برای تیپ **A** و کانال **Red** برای تیپ **Asia1**). نتایج به دست آمده در فایل اکسل به صورت تفکیکی آورده می شود .

جدول ۳-۴-۶-۳- سکانس پرایمرهای استفاده شده برای شناسائی و تعیین تیپ ویروس

تب برفکی برای آزمایش Real Time PCR

Primer Forward	FMD-F	ACTGG-GTTTT-ACAAA-CCTGT-GA
Primer Reverse	FMD-R	GCGAG-TCCTG-CCACG-GA
Taq Man prob	prob	TCCTT-TGCAC-GCCGTGGGAC

3D primers for FMD detection

Primer Forward	Type A F	ACGACCATCCACGAGCTYC
Primer Reverse	Type A R	RCAGAGGCCTGGGACAGTAG
Taq Man probe	Type A Probe	JOE-CGTGCGCATGAAACGTGCCG-BHQ2
Primer Forward	Type O F	ACGCGCAGAGGAATTCGAATCA
Primer Reverse	Type O R	ATCGYAGRTTWTTTCGGCTTAT
Taq Man probe	Type O Probe	(FAM-5-ATGCTCCGCCTCGCAGGCT-3-TAMRA
Primer Forward	Type As F	ACGCGCAGAGGAATTCGAATCA
Primer Reverse	Type As R	ATCGYAGRTTWTTTCGGCTTAT
Taq Man probe	Type As Probe	(Cy5-5-ATGCTCCGCCTCGCAGGCT-3-TAMRA

FMD multiplex typing (A, O, Asia1)

۳-۷- تعیین پاسخ آنتی بادی سرمی حاصل از پروتئین های ساختاری (SP) واکسن پس

از واکسیناسیون

وسایل و مواد مورد نیاز

(۱) سرم جنین گوساله غیر فعال شده

(۲) سلول BHK21 کلون رازی (H9)

۳) محیط کشت Stocker

۴) محیط کشت EMEM

۵) ویروس O2010/IR با تیتراژ مشخص

۶) میکروپلیت مخصوص کشت سلول

۷) انواع سمپلر و سر سمپلر

۸) پیپتور

۹) پیپت استریل ۵ و ۲۵ میلی لیتری

۱۰) انکوباتور CO₂ دار

۱۱) لوله در پیچ دار استریل ۵ میلی لیتری

روش کار:

سنجش پاسخ آنتی بادی علیه پروتئین های ساختاری از نوع اختصاصی سروتیپ می باشند. آزمایش خنثی سازی ویروس^۱ (VNT) و یا خنثی سازی سرم^۲ (SNT) یکی از معتبرترین آزمایش ها ی کمی جهت تعیین و ردیابی آنتی بادی پس از واکسیناسیون و یا عفونت، می باشد. این آزمایش علاوه بر اختصاصی بودن، بسیار حساس بوده و نیازمند تجهیزات کشت سلول، کار با ویروس زنده می باشد. ویروس مورد استفاده در این آزمایش بایستی بر روی کشت سلول منولایر تکثیر یافته و پس از تیتراسیون در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و یا ۷۰- درجه سانتی گراد تا هنگام انجام آزمایش نگهداری گردد. نمونه سرم بایستی قبل از شروع آزمایش در حرارت ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه غیر فعال گردد. تیتراژ آنتی بادی در نقطه ای که

^۱ Vural neutralization test

^۲ Serum-neutralization test

۵۰٪ از سلول ها به حالت مونولایدر مقابل **100TCID₅₀/50microliter** ویروس همولوگ

واکسن بر اساس روش **Reed and Muench** و یا **Karber** محاسبه می گردد.

۱- درون تمام خانه های میکروپلیت به جزء خانه های ستون اول توسط سمپلر ۸ کاناله مقدار ۵۰

میکرو لیتر محیط ایگل کامل حاوی ۲ درصد سرم جنینی ریخته می شود.

۲- مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه سرم خالص به دو خانه ابتدایی ستون اول منتقل گردید. بدین

ترتیب در تمام خانه های ستون اول به صورت **duplicate** نمونه های مختلف سرمی وارد شد

که در نهایت در هر میکروپلیت چهار نمونه سرمی را می توان تیترا کرد. با توجه به اضافه کردن ۵۰

میکرو لیتر ویروس در مرحله چهارم رقت نهایی سرم در اولین خانه ۱/۲ محاسبه گردید که

لگاریتم آن مساوی ۰/۳ است.

۳- با استفاده از سمپلر ۸ کاناله از خانه های ردیف اول مقدار ۵۰ میکرو لیتر برداشته شد و به خانه

های ستون دوم منتقل گردید. با دقت چند بار مخلوط شد و سپس به ستون سوم منتقل گردید.

بدین ترتیب رقت های متوالی و دو برابر رقیق شده تا آخرین ستون میکروپلیت تهیه گردید.

۴- به تمام خانه ها مقدار ۵۰ میکرو لیتر ویروس همولوگ حاوی **100TCID₅₀** واحد ویروسی (بین

۳۲ تا ۳۲۰ ویروس زنده) اضافه و در انکوباتور حاوی **5%CO₂** بر روی پلیت شیکر قرارداده شد

و به مدت یک ساعت انکوبه گردید.

۵- میکرو پلیت ها از انکوباتور خارج شدند و به هر یک از خانه ها مقدار ۵۰ میکرو لیتر از

سوسپانسیون سلولی حاوی **106 cells/ml** سلول **BHK21** کلون **H9** رازی اضافه شد و پس

از درز بندی توسط چسب های مخصوص به انکوباتور منتقل و مدت ۷۲ ساعت در شرایط ۳۷

درجه سانتی گراد و **5%CO₂** انکوبه گردید.

۶- کنترل هایی مانند آنتی سرم استاندارد با تیترا مشخص به عنوان کنترل مثبت، کنترل سلول

و کنترل محیط در نظر گرفته شد.

۷- ویروس مورد استفاده همزمان در یک میکروپلیت جداگانه تیتر شد. در نهایت، زمانی آزمایش معتبر است که تیتر ویروس مورد استفاده در هر خانه در محدوده $\log_{10} 1.5-2.5 \text{TCID}_{50}$ باشد.

۸- در خانه هایی که ویروس توسط سرم خنثی شده باشد، سلول ها به حالت مونولایر و سالم باقی می ماند. و در مقابل، خانه هایی که ویروس خنثی نشده باشد، ویروس در سلول ها تکثیر کرده و آثار سیتوپاتیک سلولی (CPE) سبب تخریب و کنده شدن سلول ها از کف می شود.

۹- پس از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت میکروپلیت ها توسط میکروسکوپ غیر مستقیم بررسی و نتایج ثبت گردید و در نهایت تمام میکروپلیت ها در روز سوم (۷۲ ساعت پس از انکوباسیون) توسط محلول رنگی حاوی ۰/۵۰ درصد متیلن بلو و ۱۰٪ فرمالین و یا محلول ۰/۴ درصد آمیدو بلاک به همراه ۸٪ اسید سیتریک رنگ آمیزی گردید. در این حالت خانه های مثبت که سلول های آن سالم مانده، کامل رنگ گرفته و خانه های منفی که ویروس در آن تکثیر یافته و سلول های آن کنده شده باشد بی رنگ باقی می ماند.

۱۰- تیتر سرم بر اساس آخرین رقتی که ۵۰ درصد خانه های آن سالم باقی مانده (XlogSN50) از طریق روش آماری Reed and muench و یا Karber محاسبه و بیان گردید.

۳-۸- آزمایش دو بعدی خنثی سازی ویروس

(Two Dimensional Virus Neutralisation Test)

برای توصیف رابطه بین سویه (سروتیپ) در گردش با سویه واکسن مورد مصرف و انتقال محافظت در برابر طیف گسترده ای از زیرگروه های آن سروتیپ استفاده می شود. عبارت دیگر برای اطمینان از اینکه آنتی ژن های موجود در واکسن ها در برابر شیوع FMD موثر آیا موثر خواهد بود یا نه استفاده می گردد.

آنتی بادی های ضد ویروس تب برفکی قدرت خنثی سازی کم یا زیاد سروتیپ های ویروسی را دارند . این توانایی است که می تواند رابطه بین سروتیپ های ویروس جدا شده در گردش را با سویه های فعلی واکسن مشخص کنید. این آزمایش با استفاده از یک سرم معلوم سویه واکسن که از قبل تیتراژ آنتی بادی همولوگ آن از پیش تعیین شده در تیتراژ ۱۰۰ **TCID₅₀** (۱۰۰ واحد عفونی ویروس که قدرت آلودگی در کشت بافت را دارد که توسط رگرسیون محاسبه می شود) در برابر دوز مشابه از ویروس های هترولوگ در گردش در فیلد انجام می شود. این آزمایش نشان می دهد که به چه میزان آنتی بادی تولید شده در اثر تزریق واکسن از نظر آنتی ژنی قدرت محافظت در برابر ویروس هترولوگ در گردش را از خود نشان می دهد.

روش آزمایش:

۱-تهیه رقت از ویروس ها : ویروس هایی که از قبل تیتراژ آن را داریم (مثلا ۵/۱۰۵) رقت ها یک دوم از ۵/۲-۱۰ تا ۵/۴-۱۰ تهیه می کنیم .

۲-آماده سازی چند پلیت ۹۶ خانه ای .یک پلیت برای **VN** ویروس مورد آزمایش یک پلیت برای تیتراسیون ویروس مورد آزمایش یک پلیت برای **VN** ویروس رفرنس یک پلیت برای تیتراسیون ویروس رفرنس

۳-محاسبات

تیتراژ ویروس ها:در هر رقت(برای هر رقت) ۸چاهک مورد استفاده قرار می گیرد برای هر چاهک که به آنها سلول **IBRS-2** و یا **BHK 21** افزوده ایم اگر ویروس به اندازه کافی رشد کند سلول ها خواهند مرد و سطح تک لایه ای از سلول ها تشکیل نخواهد شد. تیتراژ ویروس به قرار دیل محاسبه می گردد: بعنوان مثال

۸ چاهک که در آن ۱۰۰ درصد **CPE** اتفاق افتاده فرضا در رقت ۹/۴-۱۰

۷ چاهک که در آن ۱۰۰ درصد CPE اتفاق افتاده فرضاً در رقت ۵/۲-۱۰

۴ چاهک که در آن ۱۰۰ درصد CPE اتفاق افتاده فرضاً در رقت ۵/۵-۱۰

۱ چاهک که در آن ۱۰۰ درصد CPE اتفاق افتاده فرضاً در رقت ۵/۸-۱۰

برای محاسبه جمع خانه هایی که CPE صددر صد دارند بر تعداد چاهک هایی که برای رقت

استفاده شده است. یعنی ۲۰ تقسیم بر ۸ که می شود ۲/۵

بعد از آن منهای ۵/۵ می کنیم می شود ۲ و سپس ضرب در ۳/۰ می کنیم که می شود ۶/۰ و

سپس بارتی که در صددرصد چاهک ها CPE ایجاد کرده جمع می کنیم. در اینجا رقت ۹/۴ که

خواهد شد ۵/۵ بنا براین تیترو ویروس می شود ۵/۱۰۵ بنا براین

خواهیم داشت 105.5 TCID₅₀ بر میلی لیتر

محاسبه میزان شباهت آنتی ژنیتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن Relationship

value (r-value)

برای محاسبه تیترو ویروس بدست آماده از ویروس در گردش پس از VN در برابر سرم رفرنس

تقسیم بر تیترو ویروس بدست آماده از ویروس واکسن پس از VN در برابر سرم رفرنس انجام می

دهیم. اگر نتیجه r-value مقدار ۳/۰ یا کمتر از آن باشد نشان دهنده این است که واکسن

کارائی در فیلد ندارد و باید عوض شود و اگر نتیجه مقدار r-value از ۳/۰ بیشتر باشد نشان

دهنده این است که واکسن کارائی لازم را دارد.

۳-۹- روشهای تجزیه و تحلیل داده ها و نرم افزارهای مورد استفاده:

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS(Statistical Program for

Social Sciences) انجام گرفت. دراین بررسی محور قضاوت در مورد آلوده بودن نمونه ها از

کانون های مشکوک نتایج آزمایشات ELISA یا Real-Time PCR می باشد توزیع نتایج

بدست آمده بر اساس نام شهرستان و ماه جداسازی به صورت فراوانی نسبی در قالب نمودارهای

ستونی تهیه گردید. همچنین به منظور سنجش رابطه بین تراکم جمعیت گوسفند و آلودگی به ویروس در گاو، موارد مثبت گزارش شده در گاو به جمعیت گاوهای همان شهرستان تقسیم و نسبت آلودگی به دست آمده برای هر شهرستان با جمعیت گوسفند موجود در آن دو به دو مقایسه و ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید. همچنین از سیستم **Blast** در پایگاه **NCBI** برای جستجوی اسیدهای نوکلئیک مشابه با توالی‌های نوکلوتیدی بدست آمده و در برخی موارد برای تعیین درصد تشابه استفاده شد. برای مقایسه اسیدهای نوکلئیک ویروس‌های تعیین توالی شده و تعیین درصد تشابه نوکلوتیدها همچنین رسم دندروگرام‌ها از نرم افزار های **BioEdit** و **MEGA-X** استفاده گردید.

۴- نتایج

۴-۱- نتایج حاصل از آزمایش الیزا:

از نمونه‌های مشکوک آزمایش شده تعداد ۱۶۸ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت که از این تعداد ۸۶ نمونه متعلق به گاو و ۸۲ نمونه متعلق به گوسفند بود. (جدول ۴-۱-۱) با آزمایش الیزا تعداد ۵۳ نمونه مثبت و ۲۲ نمونه منفی تلقی شدند. که از این تعداد ۳۲ نمونه تیپ O ، ۱۰ ، نمونه تیپ A و یک نمونه تیپ Asia1 برای گاو و ۳۲ نمونه تیپ O ، دو نمونه تیپ Asia1 برای گوسفند تشخیص داده شد. (جدول ۴-۱-۲)

جدول ۴-۱-۱-مجموع آمار ۱۲ ماهه تشخیص بیماری تب برفکی و سروتیپ‌های آن در استان خراسان رضوی از تیر ماه سال‌های ۱۳۹۸ تا تیر ماه ۱۳۹۹

مجموع آمار ۱۲ ماهه تشخیص تب برفکی در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ در استان خراسان رضوی				
تعداد کل	تعداد و نوع دام	تعداد تیپ‌های مثبت	مجموع مثبت	مجموع منفی
۱۶۸	۸۶ گاو	۵۲ Type O	۶۰	۲۶
		۸ Type A		
		۰ Type Asia		
	۸۲ گوسفند	۴۲ Type O	۴۳	۳۹
		۱ Type Asia		

جدول ۴-۱-۲. مجموع آمار ۱۲ ماهه تشخیص بیماری تب برفکی و سروتیپ های آن در استان خراسان رضوی از تیر ماه سال های ۱۳۹۸ تا تیر ماه ۱۳۹۹ توسط آزمایش الیزا

مجموع آمار ۱۲ ماهه تشخیص تب برفکی در سال های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ در استان خراسان رضوی با استفاده از آزمایش الیزا				
تعداد	تعداد و نوع دام	تعداد تیپ های مثبت	مجموع مثبت	مجموع منفی
۸۶ گاو		۴۳ Type O	۵۰	۳۶
		۷ Type A		
		۰ Type Asia		
۸۲ گوسفند		۳۷ Type O	۳۸	۴۴
		۱ Type Asia		
۱۶۸				

۴-۲- نتایج حاصل از آزمایش Real Time PCR و کشت سلولی

با استفاده از این آزمایش تعداد ۵۳ نمونه مثبت و ۲۲ نمونه منفی در گاو و ۳۳ نمونه مثبت و ۳۳ نمونه منفی در گوسفند تشخیص داده یعنی ۶۰/۹۹ درصد از نمونه ها مثبت و ۳۹/۰۱ درصد از نمونه ها منفی بودند. (جداول ۸-۳)

جدول ۴-۲-۱- مجموع آمار ۱۲ ماهه تشخیص بیماری تب برفکی و سروتیپ های آن در

استان خراسان رضوی از تیر ماه سال های ۱۳۹۸ تا تیر ماه ۱۳۹۹

توسط آزمایش Real Time PCR

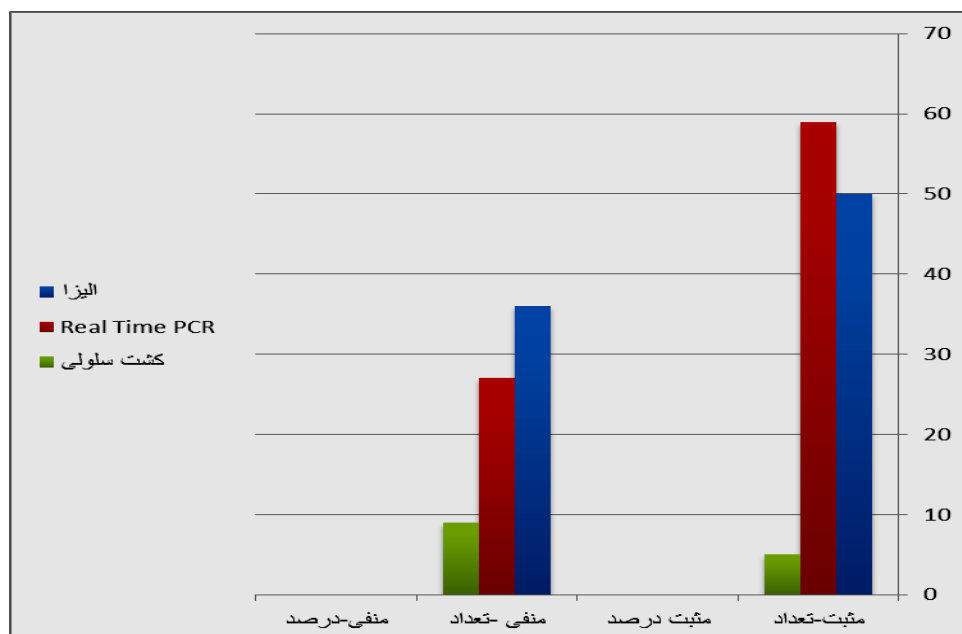
مجموع آمار ۱۲ ماهه ۹۹ و ۹۸ Real Time PCR				
تعداد	تعداد و نوع دام	تعداد تیپ های مثبت	مجموع مثبت	مجموع منفی
۸۶ گاو		۵۱ Type O	۵۹	۲۷
		۸ Type A		
		۰ Type Asia		
۸۲ گوسفند		۴۲ Type O	۴۳	۳۹
		۱ Type Asia1		
۱۶۸				

جدول ۴-۲-۲- نتایج حاصل از فراوانی آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس

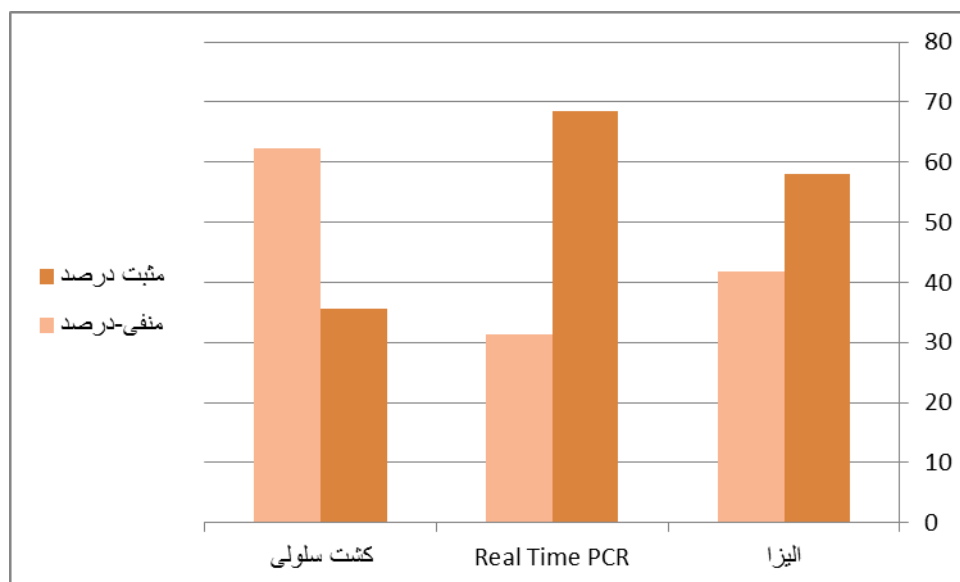
تب برفکی بر حسب نوع و نتیجه در گاو از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹ در استان خراسان

رضوی

نتیجه تست		مثبت		منفی		جمع	
نوع تست		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
الیزا		۵۰	۵۸/۱۴	۳۶	۴۱/۸۶	۸۶	۱۰۰
Real Time PCR		۵۹	۶۸/۶۰	۲۷	۳۱/۴۰	۸۶	۱۰۰
کشت سلولی		۵	۳۵/۷۱	۹	۶۴/۲۹	۱۴	۱۰۰



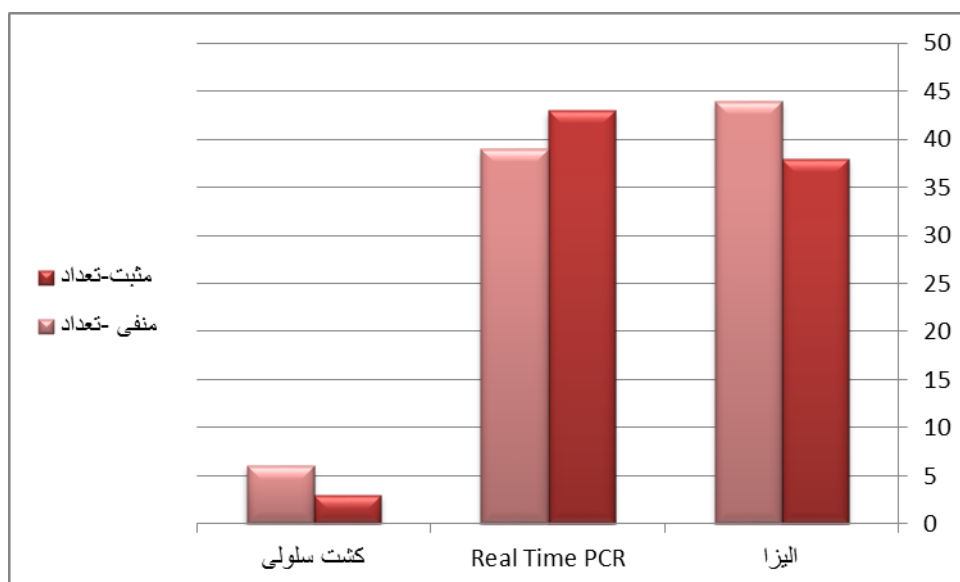
نمودار ۱-۲-۲-۴- نتایج آزمایشات حاصل از فراوانی مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب نوع و نتیجه (تعداد) در گاو از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹ در استان خراسان رضوی



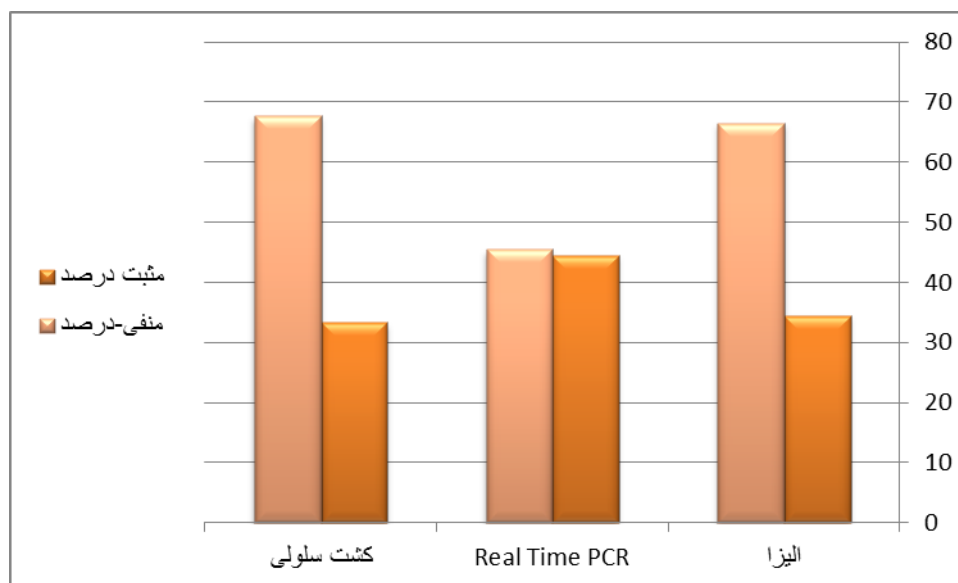
نمودار ۲-۲-۲-۴- نتایج حاصل از فراوانی آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب نوع و نتیجه (درصد) در گاو از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹ در استان خراسان رضوی

جدول ۳-۲-۴- نتایج حاصل از فراوانی آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب نوع و نتیجه در گوسفند از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹ در استان خراسان رضوی

نتیجه تست / نوع تست		مثبت		منفی		جمع
		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی
الیزا		۳۸	۴۶/۳۴	۴۴	۵۳/۶۶	۸۲
Real Time PCR		۴۳	۵۲/۴۴	۳۹	۴۷/۴۵	۸۲
کشت سلولی		۳	۳۳/۳۳	۶	۶۶/۶۷	۹



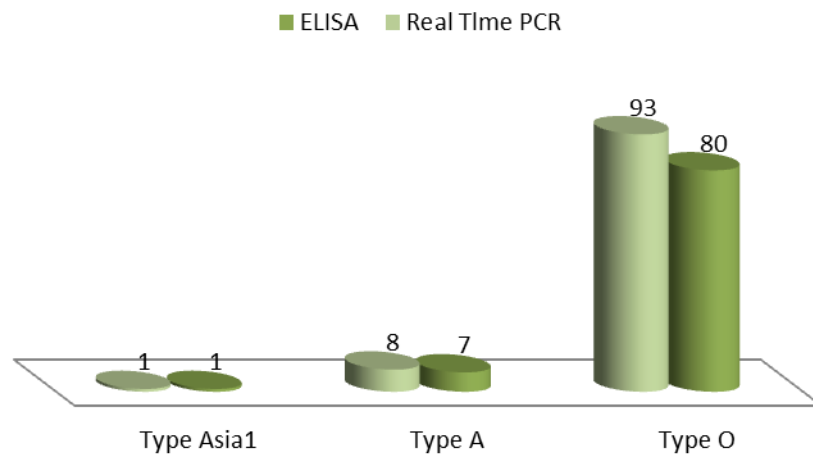
نمودار ۱-۳-۲-۴- نتایج حاصل از فراوانی آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب تعداد نوع و نتیجه (تعداد) در گوسفند از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹ در استان خراسان رضوی



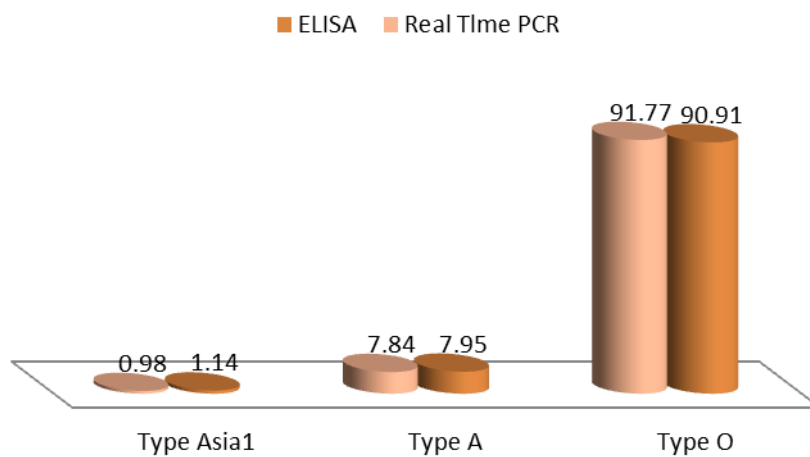
نمودار ۱-۳-۲-۴- نتایج حاصل از فراوانی آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب درصد نوع و نتیجه (درصد) در گوسفند از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹ در استان خراسان رضوی

جدول ۴-۲-۴- نتایج آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب تیپ ویروس و نتیجه از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹

جمع		Asia1		Type A		Type O		تیپ ویروس
درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	نوع آزمایش
۱۰۰	۸۸	۱/۱۴	۱	۷/۹۵	۷	۹۰/۹۱	۸۰	الیزا
۱۰۰	۱۰۲	۰/۹۸	۱	۷/۸۴	۸	۹۱/۱۷	۹۳	Real Time PCR



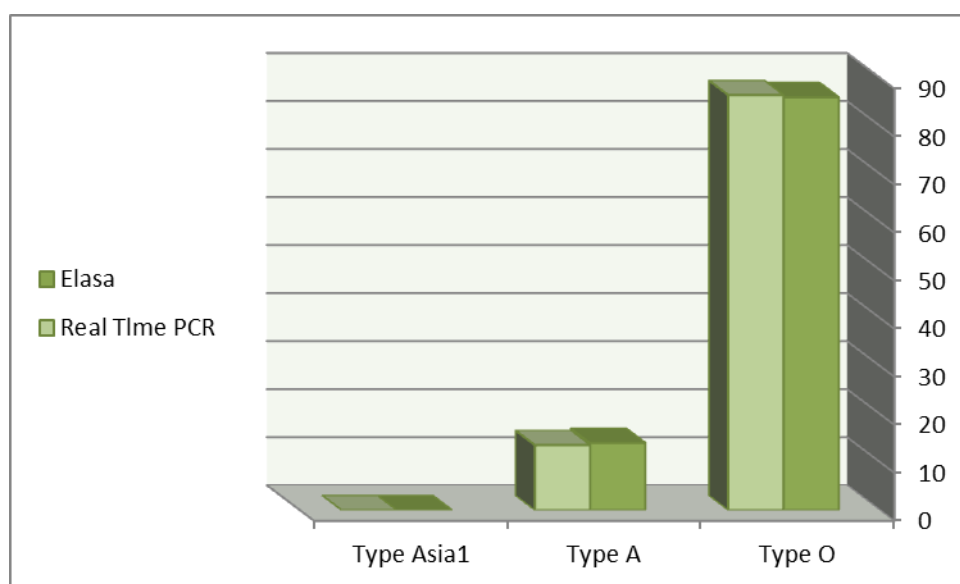
نمودار ۱-۴-۲-۴- نتایج آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب تیپ ویروس و نتیجه (تعداد) از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹



نمودار ۲-۴-۲-۴- نتایج آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب تیپ ویروس و نتیجه (درصد) از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹

جدول ۴-۲-۵- نتایج آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب
تیپ ویروس و نتیجه در گاو از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹

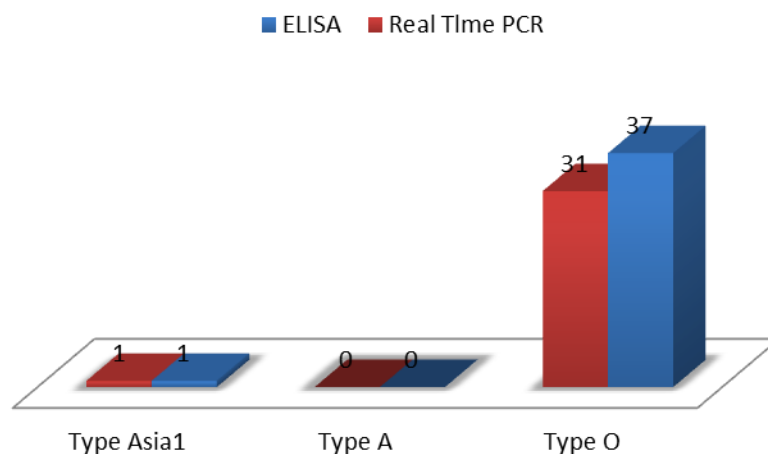
تیپ ویروس نوع آزمایش		Type O		Type A		Asia1		جمع	
		درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی
الیزا		۸۶/۰۰	۴۳	۱۴/۰۰	۷	۰	۰	۱۰۰	۵۰
Real Time PCR		۸۶/۴۴	۵۱	۱۳/۵۶	۸	۰	۰	۱۰۰	۵۹



نمودار ۴-۲-۵- نتایج آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب
تیپ ویروس و نتیجه (درصد) در گاو از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹

جدول ۴-۲-۶- نتایج آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب
تیپ ویروس و نتیجه در گوسفند از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹

جمع		Asia1		Type A		Type O		تیپ ویروس
درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	نوع آزمایش
۱۰۰	۳۸	۲/۶	۱	۰	۰	۹۷/۳۸	۳۷	الیزا
۱۰۰	۴۳	۲/۳۲	۱	۰	۰	۷۲/۱۰	۳۱	Real Time PCR

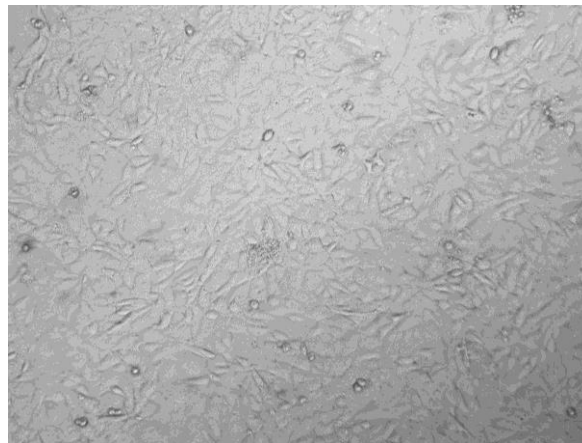


نمودار ۴-۲-۶- نتایج آزمایشات مربوط به تشخیص و جداسازی ویروس تب برفکی بر حسب
تیپ ویروس و نتیجه در گوسفند (درصد) از تیر ماه ۱۳۹۸ لغایت تیر ۱۳۹۹

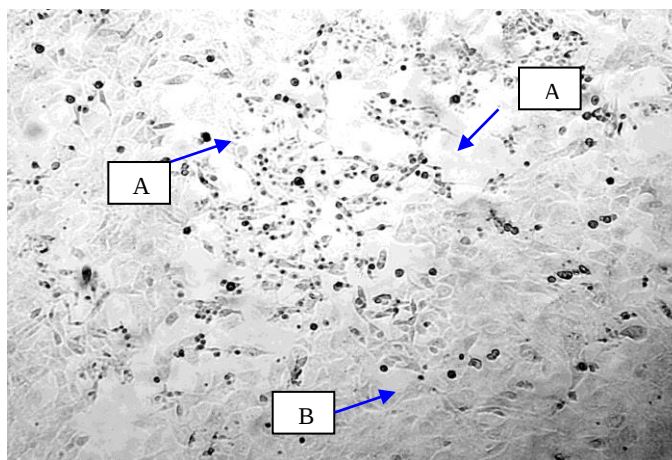
۳-۴- نتایج حاصل از کشت سلولی:

با آزمایش کشت سلولی تعداد ۸ نمونه مثبت و ۱۵ نمونه منفی تشخیص داده شد (جداول

۳-۲-۴ و ۲-۲-۴)



تصویر ۱-۳-۴- سلول‌های تازه پس از ۴۸ ساعت



تصویر ۲-۳-۴- نمونه مثبت در کشت سلولی A دیدن CPE در محل فلش

B سلول‌های فاقد CPE

۴-۴- نتایج توزیع فراوانی مطلق و نسبی توامان نتایج دو آزمایش با یکدیگر :

۴-۴-۱- توزیع فراوانی مطلق و نسبی توامان نتایج آزمایشات الیزا و RT-PCR

با تعیین ضریب کاپای نتایج بدست آمده از توضیح فراوانی مطلق و نسبی توامان نتایج آزمایشهای الیزا و **Real Time PCR** می توان نتیجه گرفت که این دو تست قدرت جایگزینی برای یکدیگر را دارند (با ضریب کاپای ۰/۸۹۵).

جدول ۴-۴-۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی توامان نتایج آزمایشات الیزا و **Real Time PCR**

نتیجه آزمایش الیزا		نتیجه آزمایش ReaTimePCR		مثبت		منفی		جمع	
				فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
مثبت				۸۸	۵۲/۳۸	۸۰	۴۷/۶۲	۱۶۸	۱۰۰
منفی				۱۰۲	۶۰/۷۱	۶۶	۳۹/۲۹	۱۶۸	۱۰۰
جمع				۱۹۰	۵۶/۵۵	۱۴۶	۴۳/۴۵	۳۳۶	۱۰۰

۴-۵- نتایج حاصل از بررسی مناطق مشکوک و آلوده:

در بررسی حاضر که طی ۱۲ ماه انجام پذیرفت، تعداد مناطق مشکوک بر اساس علائم بالینی و ارسال نمونه توسط دامپزشکان استان در ۹ ماهه سال ۹۸ یکصد و چهارده و در سه ماه سال ۹۹ (تا تیرماه) چهل و یک منطقه بود، تعداد مناطقی که وجود بیماری در آنها بر اساس آزمایشهای الیزا یا **ReaTimePCR** مورد تأیید قرار گرفتند شصت و چهار در سال ۹۸ و بیست و نه کانون در سال سه ماهه اول سال ۹۹ (تا تیر ماه) می باشد.

شهر مشهد بیشترین نمونه ارسالی و بیشترین نمونه تأیید شده را داشته است. اما حدوداً یک

سوم (۳۱/۱۱ درصد) از نمونه های ارسالی در آزمایش های یاد شده مثبت بوده است.

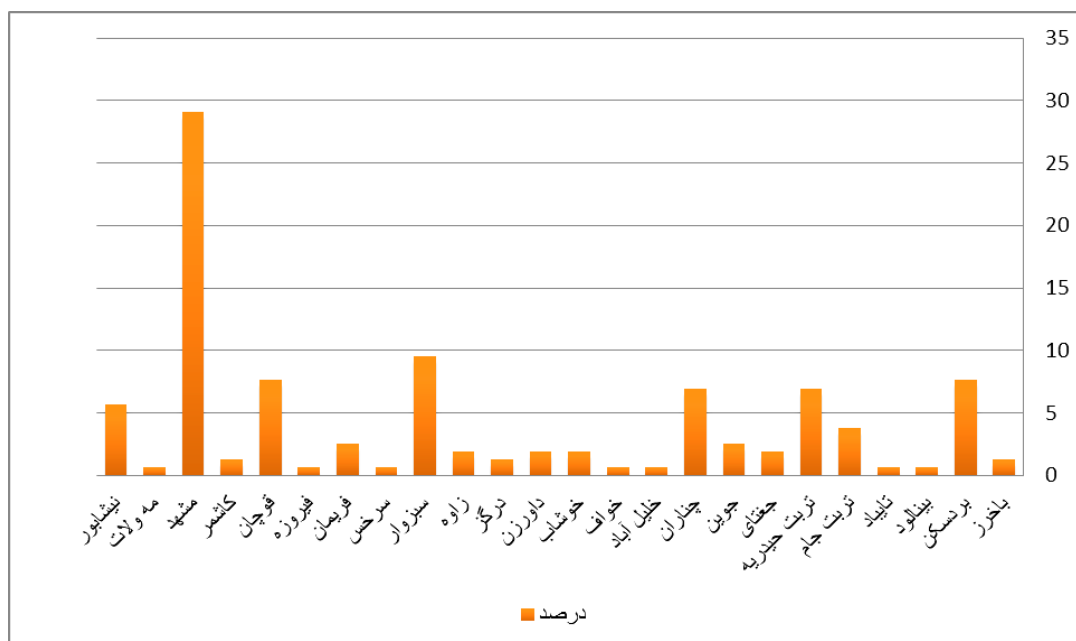
براساس نتایج مربوط به ضریب همبستگی بین دو صفت نسبت آلودگی گاوهای هر شهرستان و تراکم گوسفند آن شهرستان معین گردید که با افزایش تراکم گوسفند نسبت آلودگی در گاو کاهش می یابد ($r = -0.431$) اما آزمون t مربوطه این اختلاف را معنی دار ندانست. ($P = 0.383$)

بیشترین زمان گزارش بیماری و ارسال نمونه فصل زمستان (زمستان ۹۸) ، بیشترین درصد تائید بیماری از نمونه های ارسالی در فصل پائیز (پائیز ۹۸) و بیشترین درصد آزمایش منفی از نمونه های ارسالی در فصل تابستان (تابستان ۹۸) می باشد.

جدول ۴-۵-۱: توزیع فراوانی و درصد ارسال نمونه و جواب آزمایش های تاییدی بیماری تب

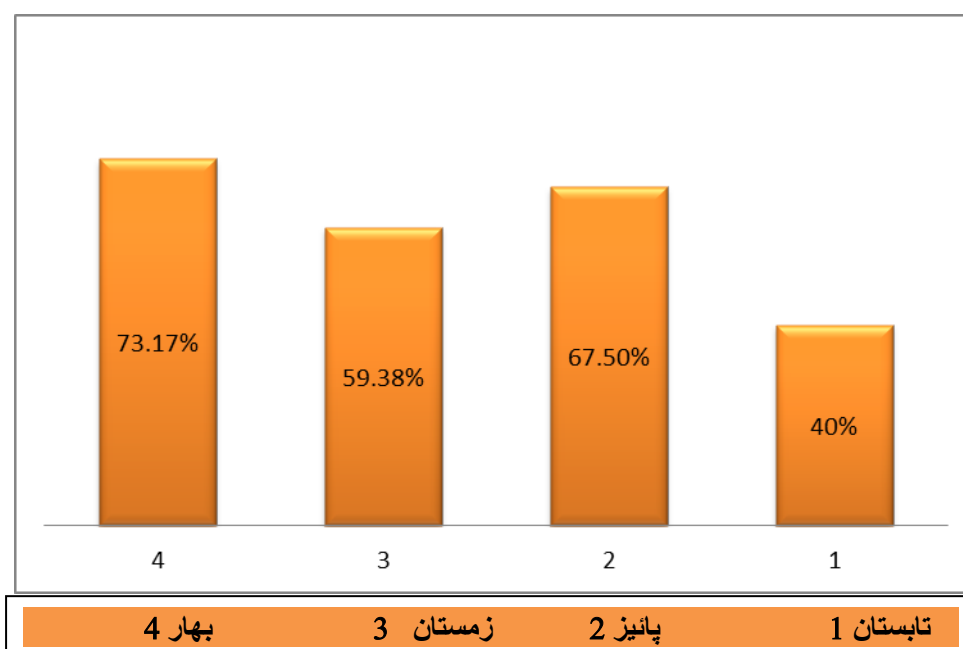
برفکی بر اساس فصل سال در استان خراسان رضوی

نتیجه آزمایش		مثبت		منفی		جمع
نام فصل		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی
تابستان ۹۸		۱۰	۴۰	۱۵	۶۰	۲۵
پاییز ۹۸		۲۷	۶۷/۵	۱۳	۳۲/۵	۴۰
زمستان ۹۸		۳۸	۵۹/۳۸	۲۶	۴۰/۶۲	۶۴
بهار ۹۹		۳۰	۷۳/۱۷	۱۱	۲۶/۸۳	۴۱



نمودار ۴-۵-۱- توزیع فراوانی نسبی شهرستان های آلوده به ویروس تب برفکی بر حسب

نتایج الیزا یا Real Time PCR و نام شهرستان



نمودار ۴-۵-۲: توزیع فراوانی تایید بیماری تب برفکی بر حسب فصل سال

در خراسان رضوی

۴-۶- نتایج حاصل از تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک:

۴-۶-۱- نتایج حاصل از تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ O

تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی

> A-As1-IR-KR-2019

GTCGCTCAGTTTTGGAGAGTTCGACCTCACATCGGAGAAGAAGAAGGGCCAGGGTTGG
 ACTCGACGTCTCCTGCCAATTTGAGCAGGTCTGAAGTTCAGGAGCTGCTTTGCGGGTGCAA
 TGATCTTCTGCTTGTGTCTGTCCTGCGACGACACTTCCACTGCCAGCAGTGGTCGGGGGC
 AGTAGAGCTCGGCACGTTTCATGCGCACGAGAAGCTCGTGGATGGTCGTGGCTCGAATT
 GCACCAAAGTTGAAGGAGCTGGGTAGCTGTGCGGCGACCCGCGCCGCAAGGGACCCCA
 GGTGCCCCCTTCTACCACCACCAGTTGTGGAGTACTTGCTTACCCCGTTGTACTGTGTC
 CAACACTCGGTGCGGCGCAGTGTAAGGGAGCGCAAGTCTCGTAAACGGCTGCCTGTGGT
 AGGCGGTGGGGTTGCTTGTGTTGGCCAGGGCTCCCTCAGGCGCTCCGTTGGGTACCCAC
 GTCAAGTTGCCATCGTGACGCACCACAATCTCCAGGTCAGAGAAGTAGTACGTGGCTGCA
 CGCAAAGGGCACCCACCAGCGCGTGGTGGTGTGTTTGCATGAGGTCAATGACGTGCGT
 GGGGCCACAGGGTTGATTTTCACAAACCTGTCCATGATGAAGCCGACGTCCGTGTGGTG
 ACGTCGCTGAGCCTGTGTCTCACCACCGTAGTTCTCGACGGTGGTGGTGACAGGGTCTGC
 TGATTCCCCGGCAGTGGTGGTTTTCGTGCGGGGGTCAATTGGGAGGCGCAGTTCAAAGT
 CTGTGC

>A- Ni1-IR-KR -2019

GGGCTTCTACAGTTTGGAGAGTTCGACCTCACATCGGAGAAGAAGAAGGGCCAGGGT
 TGGACTCGACGTCTCCTGCCAATTTGAGCAGGTCTGAAGTTCAGGAGCTGCTTTGCGGGTG
 CAATGATCTTCTGCTTGTGTCTGTCCTGCGACGACACTTCCACTGCCAGCAGTGGTCGGGG
 GCAGTAGAGCTCGGCACGTTTCATGCGCACGAGAAGCTCGTGGATGGTCGTGGCTCGAA
 TTGCACCAAAGTTGAAGGAGCTGGGTAGCTGTGCGGCGACCCGCGCCGCAAGGGACCCC
 AGGTCGCCCCCTTCTACCACCACCAGTTGTGGAGTACTTGCTTACCCCGTTGTACTGTG
 CCAACACGCGGTGCGGCGCAGTGTAAGGGAGCGCAAGTCTCGTAAACGGCTGCCTGTGG
 TAGGCGGTGGGGTTGCTTGTGTTGGCCAGGGCTCCCTCAGGCGCTCCGTTGGGTACCCAC

GTCAAGTTGCCATCGTGACGCACCACAATCTCCAGGTCAGAGAAGTAGTACGTGGCTGCA
 CGAAAAGGGCACCCACCAGCGCGTGGTGGTGTGTTTGCATGAGGTCAATGACGTGCGT
 GGGGCCCACAGGGTTGATTTTCACAAACCTGTCCATGATGAAGCCGACGTCCGTGTGGTG
 ACGTCGCTGAGCCTGTGTCTCACCACCGTAGTTCTCGACGGTGGTGGTGACAGGGTCTGC
 TGATTCCCCGGCAGTGGTGGTTTGC GTGCGGGGGTCAATTGGGAGGCGCAGTTCAAAGT
 CTTGCCC

تصویر ۴-۶-۱: توالی نوکلئوتیدی دو ویروس تیپ **A** تعیین توالی شده از نمونه‌های مثبت

بیماری تب برفکی، استان خراسان رضوی در سال ۱۳۸۹

۴-۶-۲- نتایج حاصل از تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ **O**

تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی

>O-As1-IR-KR-2020

AAGCAATGGAGCAAGTCGAGTTCAGGAGTTGTCTTGCAGGTGCCACTATCTTTTGCTTGT
 GTCTTGCTTCGTTCCGGGTGGATGGCCAGAAGAGGCCGGGGGCAGTATGTTTCAGCCCTCT
 TCATACGGTAAAGCAGTTCGGTCACCCGAGTAGCTTTGATGGCACCGTAGTTGAAGGAA
 GTAGGCAACGCCCTCGCTGCCTTTTGGGTCAACACCTGCAGATCACCCCTCACATTGGTTG
 CACGGCTCTCACTGTACTTGCAATTCCCGTTGTAAACGGTAGCCAAAACACGGTGTGGTG
 CCGTGTAGGGCAGTGCAAGACGAGGGAGCGGTGCCTTGTGGTCAGCCGCTGGGTTGGC
 GCGGCT

>O-As2-IR-KR-2020

ACGCAGTGAGCAGGTTCGAGTTCAGGAGTTGTCTTGCAGGTGCCACTATCTTTTGCTT
 GTGTCTTGCTTCGTTCCGGGTGGATGGCCAGAAGAGGCCGGGGGCAGTATGTTTCAGCCC
 TCTTCATACGGTAAAGCAGTTCGGTCACCCGAGTAGCTTTGATGGCACCGTAGTTGAAGG
 AAGTAGGCAACGCCCTCGCTGCCTTTTGGGTCAACACCTGCAGATCACCCCTCACATTGGT
 TGCACGGCTCTCACTGTACTTGCAATTCCCGTTGTAAACGGTAGCCAAAACACCCTGTGAA
 GA

>O-Ni2-IR-KR-2020

AGGGCCCGCTCAGTACTACGCGCAGTACAGTGGCACCATCAACCTGCACTTCATGTTTAC
CGGGCCCACTGACGCGAAAGCGCGTTACATGATTGCATACGCCCCCCCCGGCATGGAGC
CGCCCAAGACACCCGAGGCGGCTGCCACTGCATTACGCGGAGTGGGACACTGGGTTG
AATTCAAATTTACATTCTCAATCCCTTACCTCTCGGCGGTGATTACGCGTACACCGCGTCT
GAACCGCTGAGACTACAAATGTCCGGCATGGACGCGCCTCTCTCCACCCCC

تصویر ۴-۶-۲: توالی نوکلئوتیدی سه ویروس تیپ O تعیین توالی شده از نمونه‌های مثبت

تب برفکی، استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹

۴-۷- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک ویروس‌های جدا شده از استان با سایر ویروس‌های جدا شده از استان خراسان رضوی، ایران و منطقه که در بسیاری از موارد توالی اسید نوکلئیک آنها در بانک ژن موجود می‌باشد.

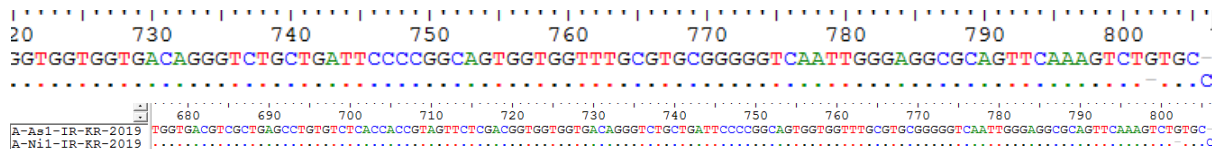
۴-۷-۱- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ A تعیین توالی

شده از استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۸

نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ A تعیین توالی شده از

استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۸ در تصویر ۴-۷-۱ آورده شده است.

	10	20	30	40	50	60	70	80
A-As1-IR-KR-2019	GTGCTCAGTTTGGAGAGTTCGACCTCACATCGGAGAAGAAGAAGGGC	CCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCTGCC						
A-Ni1-IR-KR-2019	GGGC.TC..ACAG							
	80	90	100	110	120	130	140	150
A-As1-IR-KR-2019	CCAATTGAGCAGGTGGAAGTTGAGGAGTGGCTTTCGCGGTGCAATGATCTCTG	CTTGTTCTGTCTCTCGACGACACTI						
A-Ni1-IR-KR-2019								
	160	170	180	190	200	210	220	230
A-As1-IR-KR-2019	CTTCCAC-TGCCAGCAGTGGTCGGGGGCAGTAGAGCTCGGCACGTTTCATGCGCACGAGAAGCTCG	TGGATGGTCTGTTGGCT						
A-Ni1-IR-KR-2019								
	240	250	260	270	280	290	300	310
A-As1-IR-KR-2019	GGCTCGAATTGCAACCAAGTTGAAGGAGCTGGGTAGCTGTGCGGCGACCCGCGCCGCAAGGGACCCAGGTGCGCCCTTCTACCA							
A-Ni1-IR-KR-2019								
	320	330	340	350	360	370	380	390
A-As1-IR-KR-2019	TACCAACCACAGTTGTGGAGTACTTG-CTTACCCCGTTGTACTGTTGC-CAACACTCGGTG-CGGCGCAGTGTAAAGGAGC							
A-Ni1-IR-KR-2019								
	400	410	420	430	440	450	460	470
A-As1-IR-KR-2019	GAGC-GCAAGT-CTCGTAAACGGCTGCTGTGGTAG-GCGG-TGGGGTTGCTTGTGTTG-GCCAGGGCTCCCTCAGGCGCTC							
A-Ni1-IR-KR-2019								
	480	490	500	510	520	530	540	550
A-As1-IR-KR-2019	GCGCTCCGTTGGGTACCCACGTCAAGTTGCCATCGTGACGCACCAATCTCCAGGT-CAGAGAAGTAGTACGTGGCTGCACGC							
A-Ni1-IR-KR-2019								
	560	570	580	590	600	610	620	630
A-As1-IR-KR-2019	ACGCAAAAGGGGACCCACAGCGCTGGTGGTGTGTTTGCATGAGGTCAATGACGTGCGTGGGGCCACAGGGTTGATTTTCAC							
A-Ni1-IR-KR-2019								
	640	650	660	670	680	690	700	710
A-As1-IR-KR-2019	TTCAACAACTGTCCATGA-TGAAGCCGACGTCCGTGTGGTGACGTGCGCTGAGCCTGTGTCTCACCACCGTAGTTCTCGACGGT							
A-Ni1-IR-KR-2019								



تصویر ۴-۷-۱- مقایسه ۸۰۶ نوکلئوتید و ویروس تب برفکی تیپ‌های A تعیین توالی شده از

استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۸ با نرم افزار BioEdit

۴-۷-۲- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ A تعیین توالی

شده از استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۸ با دو ویروس واکسن تیپ A ایران ثبت شده در

بانک ژن



	720	730	740	750	760	770	780	790	800
A-As1-IR-KR-2019	TGAGCCTGTGTCACCAACCGTAGTTCTCGACGGTGGTGACAGGGTCTGCTGATTCCCGGGCAGTGGTGGTTTGGTGGCGG								
A-Nil-IR-KR-2019	TGAGCCTGTGTCACCAACCGTAGTTCTCGACGGTGGTGACAGGGTCTGCTGATTCCCGGGCAGTGGTGGTTTGGTGGCGG								
Vac-A-IRN/23/2015	TGAGTCCAAACCTGG--GCCCTTCTCTCGCCGACGTGAGGTGCAACTTTTCCAAACTGGTGGAAACCATCAACCAAGATGCA								
Vac-A/IR/32/2013	TGAGTCCAAACCTGG--ACCCCTTTTCTCTCGCCGACGTGAGGTGCAACTTTTCTAAGCTGGTGGTGAACCATCAACCAAGATGCA								
	770	780	790	800	810	820	830	8	
A-As1-IR-KR-2019	GGGTCCTGCTGATTCCCGGGCAGTGGTGGTTTGGCTGCGGGGGTCAATTGGGAGGCGCAGTTCAAAGTCTGTGC---								
A-Nil-IR-KR-2019	GGGTCCTGCTGATTCCCGGGCAGTGGTGGTTTGGCTGCGGGGGTCAATTGGGAGGCGCAGTTCAAAGTCT-TGCCC-								
Vac-A-IRN/23/2015	AACTTTTCCAAACTGGTGGAAACCATCAACCAAGATGCAAGGAGAGCGA								
Vac-A/IR/32/2013	AACTTTTCTAAGCTGGTGGTGAACCATCAACCAAGATGCA								

تصویر ۴-۷-۲- مقایسه ۸۳۹ نوکلئوتید و ویروس تب برفکی تیپ‌های A تعیین توالی شده از

استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۸ و دو ویروس واکسن تیپ A ایران ثبت شده در بانک ژن با

نرم افزار BioEdit

۴-۷-۳- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ A تعیین توالی

شده در سال ۲۰۱۹ میلادی همراه با ویروس های A تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲ تا

۲۰۱۴ میلادی از استان خراسان رضوی و دو ویروس واکسن تیپ A ایران ثبت شده در بانک ژن

با نرم افزار BioEdit انجام شد که نتایج آن ضمیمه می باشد.

۴-۷-۴- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ A تعیین توالی

شده در سال ۲۰۱۹ میلادی همراه با ویروس های A تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲ تا

۲۰۱۴ میلادی از استان خراسان رضوی و ویروس های تیپ A ایران و کشورهای همسایه)

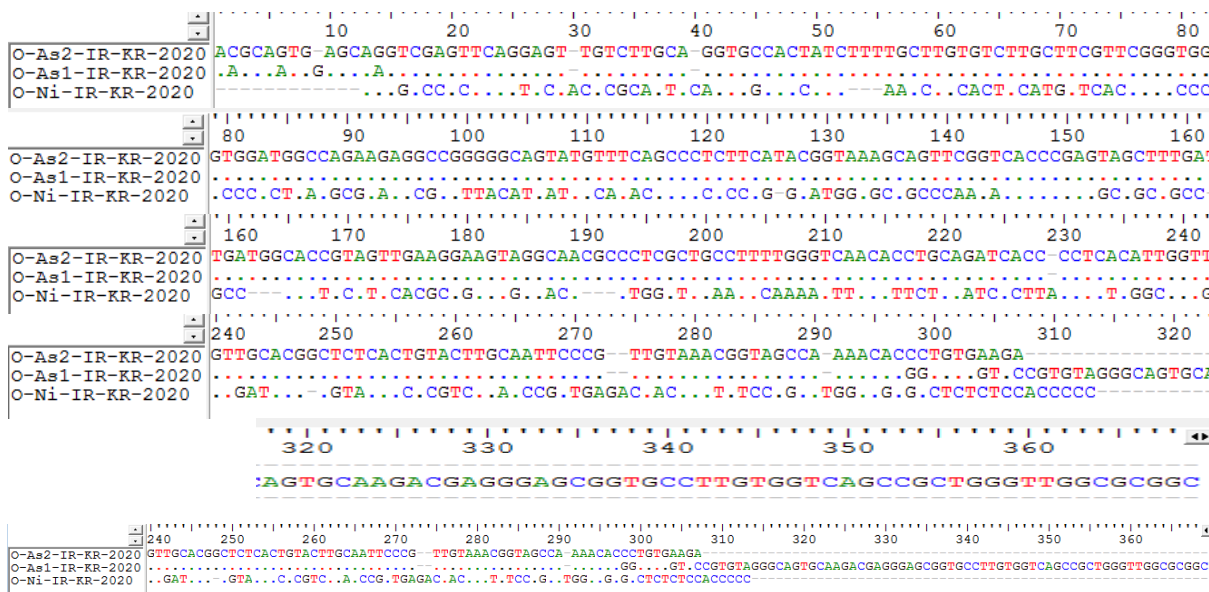
ویروس های A که نتایج BLAST در NCBI از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس

تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن با نرم افزار

BioEdit انجام شد ، که نتایج آن ضمیمه می باشد.

۴-۷-۵- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ O تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹

نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک دو ویروس تب برفکی تیپ O تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹ در تصویر ۸-۸-۲ آورده شده است.

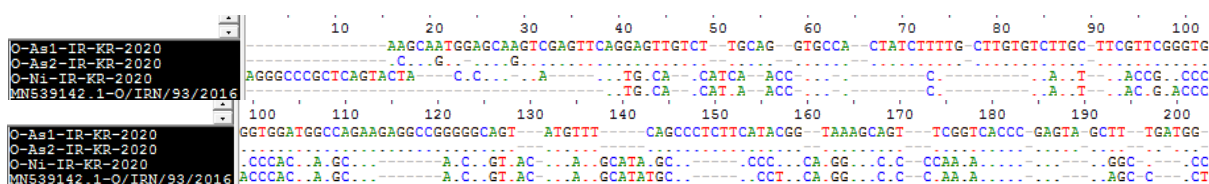


تصویر ۴-۷-۵- مقایسه ۳۶۹ نوکلئوتیدسه ویروس تب برفکی تیپهای O تعیین توالی شده از

استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹ با نرم افزار BioEdit

۴-۷-۶- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک سه ویروس تب برفکی تیپ O تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹ با ویروس واکسن تیپ O ایران ثبت شده در بانک

ژن





تصویر ۴-۷-۶- مقایسه ۴۳۴ نوکلئوتیدسه ویروس تب برفکی تیپ‌های O تعیین توالی شده از

استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹ و ویروس واکسن تیپ O ایران ثبت شده در بانک ژن

با نرم افزار BioEdit

۴-۷-۷- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک سه ویروس تب برفکی تیپ O تعیین

توالی شده در سال ۲۰۱۹ میلادی همراه با ویروس های O تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲

تا ۲۰۱۴ میلادی از استان خراسان رضوی و ویروس واکسن تیپ O ایران و ویروس های تیپ O

تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی و ثبت شده در بانک ژن با نرم افزار BioEdit انجام

شد.

```
O-As1-IR-KR-2020
O-As2-IR-KR-2020
O-Ni-IR-KR-2020
MN539142.1-O-vacc-O/IRN/93/2016
HQ663879.1-KhR-Sho-O-Iran/1/2010
JN652665.1-O/IRN/1/2010-KhR-Zibaei-Ahm
HQ450646.1-O-KhR-Sho-zibaei
HQ450645.1-O KhR-Zibaei-2010
JF916987.1-O-KhR-Zibaei-O/IRN/100/2010
JF916986.1-KhR-zibaei-O/IRN/246/2010
JF916985.1 KhR-Zibaei-O/IRN/2/2010
HQ663880.1-KhR-Zibaei-Shok-Iran/1/2010
A11-KHR3 2013-01-O
A11-KHR3 2013-01-O
A11-N-F3-KHR-01-O
B10-N-G-Gp-02-KHR-O
B11-KHR4-02-O
B11-N-F4-KHR-O 02
C11-N-F5KHR-O-2 03
G06-p6-NP4-KHR-2012-10-26-O
```

تصویر ۴-۷-۷- نام ویروس های تیپ **O** حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک تعیین توالی شده در سال ۲۰۲۰ میلادی همراه با ویروس های **O** تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴ میلادی در استان خراسان رضوی و ویروس واکسن تیپ **O** و ویروس های تیپ **O** تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی ثبت شده در بانک ژن با نرم افزار **BioEdit**

۴-۷-۸- نتایج حاصل از مقایسه اسیدهای نوکلئیک سه ویروس تب برفکی تیپ **O** تعیین توالی شده در سال ۲۰۱۹ میلادی همراه با ویروس های **O** تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴ میلادی از استان خراسان رضوی و ویروس های تیپ **O** ایران و کشور های همسایه (ویروس های **O** ی که در نتایج **BLAST** در **NCBI** از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس های تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن با نرم افزار **BioEdit** انجام شد که نتایج آن ضمیمه می باشد.

۴-۸- نتایج حاصل از میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس های جدا شده

۴-۸-۱- نتایج حاصل از میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس **A** جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۱۹ میلادی همراه با ویروس های **A** تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴ میلادی از استان خراسان رضوی و ویروس های تیپ **A** ایران و کشور های همسایه (ویروس های **A** که در بررسی حاصل از **BLAST** در **NCBI** از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نتایج نرم افزار **BLAST** و نرم افزار **MEGA** .

جدول ۴-۸-۱- نتایج میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس **A (A-As -IR-KR-2019)**

جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۱۹ میلادی همراه با ویروس های **A** تعیین توالی شده کشور های همسایه ده ویروس **A** که در بررسی حاصل از **BLAST** در **NCBI** از نظر اسید

های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند)
ثبت شده در بانک ژن (آنهایی که در NCBI ثبت شده اند).

BLAST® » blastn suite » results for RID-N38GS55R014

Job Title A-Ni-IR-KR-2019 -BLAST ALL ...
RID N38GS55R014 Search expires on 09-05 10:10 am
Program BLASTN
Database nt
Query ID IctQuery_22659
Description None ...
Molecule type dna
Query Length 779

Descriptions

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Foot-and-mouth disease virus - type A strain Pak_A_KCH-15_12 VP1 gene, partial cds	1014	1014	81%	0.0	95.56%	KU360079.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate Pak_A_JCT_276_12 VP1 gene, partial cds	1014	1014	81%	0.0	95.56%	KU258637.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate IRN/1/2011 VP1 gene, partial cds	1020	1020	82%	0.0	95.46%	KY091292.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/NIAB/PUN/PAK/162/2016 structural protein gene, partial cds	998	998	81%	0.0	95.10%	MF140440.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/NIAB/PUN/PAK/119/2015 structural protein gene, partial cds	998	998	81%	0.0	95.10%	MF374993.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate PAK5/2006 polyprotein gene, complete cds	1182	1182	97%	0.0	94.85%	EF494488.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/BAL/PAK/Iso-2/2011 capsid protein gene, partial cds	998	998	82%	0.0	94.84%	JX435106.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/PAK/5/2006 VP1 (1D) gene, partial cds	992	992	82%	0.0	94.66%	FJ755084.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/AFG/44/2007 VP1 (1D) gene, partial cds	992	992	82%	0.0	94.66%	FJ755089.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/AFG/6/2007 VP1 (1D) gene, partial cds	987	987	82%	0.0	94.52%	FJ755097.1

جدول ۴-۸-۱-۲- نتایج میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس A (A-Ni-IR-KR-2019) جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۱۹ میلادی همراه با ویروس های A تعیین توالی شده کشور های همسایه ده ویروس A که در بررسی حاصل از BLAST در NCBI از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن (آنهایی که در NCBI ثبت شده اند).

BLAST® » blastn suite » results for RID-N3GJE0DR016

Job Title: A- NI1-IR-KR -2019 and All ...
 RID: N3GJE0DR016 Search expires on 09-05 12:27 pm
 Program: BLASTN
 Database: nt
 Query ID: Id|Query_15067
 Description: None ...
 Molecule type: dna
 Query Length: 763

Descriptions

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Foot-and-mouth disease virus - type A strain Pak_A_KCH-15_12 VP1 gene, partial cds	1009	1009	80%	0.0	95.42%	KU360079.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate Pak_A_ICT_276_12 VP1 gene, partial cds	1009	1009	80%	0.0	95.42%	KU258637.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate IRN/1/2011 VP1 gene, partial cds	1014	1014	81%	0.0	95.31%	KY091292.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/NIAB/PUN/PAK/162/2016 structural protein gene, partial cds	992	992	80%	0.0	94.94%	MF140440.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/NIAB/PUN/PAK/119/2015 structural protein gene, partial cds	992	992	80%	0.0	94.94%	MF374993.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/BAL/PAK/iso-2/2011 capsid protein gene, partial cds	992	992	81%	0.0	94.68%	JX433106.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate PAK5/2006 polyprotein gene, complete cds	1161	1161	97%	0.0	94.63%	EF494488.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/PAK/5/2006 VP1 (1D) gene, partial cds	967	967	81%	0.0	94.52%	FJ753084.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/AFG/44/2007 VP1 (1D) gene, partial cds	967	967	81%	0.0	94.52%	FJ753009.1
Foot-and-mouth disease virus - type A isolate A/AFG/6/2007 VP1 (1D) gene, partial cds	961	961	81%	0.0	94.37%	FJ753007.1

جدول ۴-۸-۱-۳- نتایج حاصل از میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس A جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۱۹ میلادی همراه با ویروس های A تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴ میلادی از استان خراسان رضوی و ویروس های تیپ A ایران و کشور های همسایه (ویروس های A که در بررسی حاصل از BLAST در NCBI از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA

MX: Text File Editor and Format Converter

File

Edit

Search

Display

Utilities

۴-۸-۲- نتایج حاصل از میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس O جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۲۰ میلادی همراه با ویروس های O تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴ میلادی از استان خراسان رضوی و ویروس های تیپ O ایران و کشور های همسایه (ویروس های A که در بررسی حاصل از BLAST در NCBI از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نتایج نرم افزار BLAST و نرم افزار MEGA .

جدول ۴-۸-۲-۱- نتایج میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس-IR-KR-O-As1)

O (2020) جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۲۰ میلادی همراه با ویروس های O تعیین توالی شده کشور های همسایه ده ویروس O که در بررسی حاصل از BLAST در NCBI از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن (آنهایی که در NCBI ثبت شده اند).

BLAST  » [blastn suite](#) » results for RID-N3MHXVB014

Job Title [O-As1-IR-KR-2020 And All ...](#)
 RID [N3MHXVB014](#) Search expires on 09-05 13:35 pm
 Program BLASTN
 Database nt
 Query ID lc|Query_11875
 Description None ...
 Molecule type dna
 Query Length 364

Descriptions

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Foot-and-mouth disease virus - type O strain Q/VR/CAMB/FAISLABAD1/PUN/PAK structural protein gene, partial cds	525	525	92%	6e-145	94.93%	MK292142.2
Foot-and-mouth disease virus - type O strain Q/VR/CAMB/SAHIWAL1/PUN/PAK structural protein gene, partial cds	520	520	92%	3e-143	94.63%	MK292143.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate Q/VR/CAMB/BHAKHAR3/PUN/PAK structural protein VP-1 gene, partial cds	514	514	92%	1e-141	94.33%	MK342186.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate Q/VR/CAMB/LOORAH1/PUN/PAK structural protein VP-1 gene, partial cds	514	514	92%	1e-141	94.33%	MK342179.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate Q/NIAB/PUN/PAK/226/2017 VP1 gene, partial cds	514	514	90%	1e-141	94.63%	MH085208.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate Q/NIAB/PUN/PAK/220/2017 VP1 gene, partial cds	514	514	90%	1e-141	94.63%	MH085203.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate Q/NIAB/PUN/PAK/216/2017 VP1 gene, partial cds	514	514	90%	1e-141	94.63%	MH085204.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate Q/NIAB/PUN/PAK/205/2016 structural protein gene, partial cds	514	514	90%	1e-141	94.63%	MF140436.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate Q/VR/CAMB/Gujrat/PUN/PAK structural protein VP-1 gene, partial cds	506	506	92%	7e-140	94.03%	MK342182.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate Q/NIAB/PUN/PAK/222/2017 VP1 gene, partial cds	506	506	90%	7e-140	94.53%	MH085206.1

جدول ۴-۸-۲- نتایج میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس (O-As2-IR-KR-2020)

O جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۲۰ میلادی همراه با ویروس های **O** تعیین توالی شده کشور های همسایه ده ویروس **O** که در بررسی حاصل از **BLAST** در **NCBI** از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن (آنهايي که در **NCBI** ثبت شده اند).

BLAST » blastn suite » results for RID-N3N9XA77014

Job Title: O-As2-IR-KR-2020 And All ...
 RID: N3N9XA77014 Search expires on 09-05 13:45 pm
 Program: BLASTN
 Database: nt
 Query ID: Id|Query_63147
 Description: None ...
 Molecule type: dna
 Query Length: 300

Descriptions

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Foot-and-mouth disease virus - type O strain O/VR/CAMB/FAISLABAD1/PUN/PAK structural protein gene, partial cds	425	425	91%	5e-115	94.55%	MK292142.2
Foot-and-mouth disease virus - type O strain O/VR/CAMB/SAHWAL1/PUN/PAK structural protein gene, partial cds	420	420	91%	3e-113	94.10%	MK292143.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/VR/CAMB/BHAKHAR3/PUN/PAK structural protein VP-1 gene, partial cds	414	414	91%	1e-111	93.62%	MK342186.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/VR/CAMB/LODRAH1/PUN/PAK structural protein VP-1 gene, partial cds	414	414	91%	1e-111	93.62%	MK342179.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/NIAB/PUN/PAK/226/2017 VP1 gene, partial cds	414	414	89%	1e-111	94.42%	MH085208.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/NIAB/PUN/PAK/220/2017 VP1 gene, partial cds	414	414	89%	1e-111	94.42%	MH085205.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/NIAB/PUN/PAK/216/2017 VP1 gene, partial cds	414	414	89%	1e-111	94.42%	MH085204.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/NIAB/PUN/PAK/205/2016 structural protein gene, partial cds	414	414	89%	1e-111	94.42%	MF140436.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/VR/CAMB/Gujrat/PUN/PAK structural protein VP-1 gene, partial cds	409	409	91%	5e-110	93.45%	MK342182.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/NIAB/PUN/PAK/10/2014 capsid protein gene, partial cds	409	409	96%	5e-110	92.10%	KX984019.1

جدول ۴-۸-۲-۳- نتایج میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس O (O-Ni-IR-KR-2020) جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۲۰ میلادی همراه با ویروس های O تعیین توالی شده کشور های همسایه ده ویروس O که در بررسی حاصل از BLAST در NCBI از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن (آنهايي که در NCBI ثبت شده اند).

BLAST [®] » [blastn suite](#) » results for RID-N3NWWHYU014

Job Title [O_Ni2_IR_KR_2020 and All ...](#)
RID [N3NWWHYU014](#) Search expires on 09-05 13:58 pm
Program BLASTN
Database nt
Query ID IdlQuery_19291
Description [None](#)
Molecule type dna
Query Length 291

Descriptions

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate PAK/14/2017, complete genome	367	367	93%	2e-103	92.34%	MH784405.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate PAK/4/2017, complete genome	361	361	93%	1e-101	91.97%	MH784404.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate PAK/10/2016, complete genome	361	361	93%	1e-101	91.97%	MH784403.1
Foot-and-mouth disease virus - type O strain FMDV_O/PAK ICT-106/2012 P1 gene, partial cds	361	361	93%	1e-101	91.97%	KU330146.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/SWL/PAK/16/2010 polyprotein gene, partial cds	361	361	93%	1e-101	91.97%	JX170752.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/BWP/PAK/13/2010 polyprotein gene, partial cds	361	361	90%	1e-101	92.80%	JX170749.1
Foot-and-mouth disease virus - type O strain O/TUR/1112/2010, complete genome	375	375	93%	5e-100	91.61%	MN062585.1
Foot-and-mouth disease virus - type O strain Pak/O/KCH-36/11 P1 gene, partial cds	375	375	93%	5e-100	91.61%	KU365846.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate O/PAK/1/2010 capsid protein gene, partial cds	375	375	93%	5e-100	91.61%	KR149704.1
Foot-and-mouth disease virus - type O isolate TUR/16/2010 capsid protein gene, partial cds	375	375	93%	5e-100	91.61%	KJ631713.1

جدول ۴-۲-۸-۴ نتایج حاصل از میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس O جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۲۰ میلادی همراه با ویروس های O تعیین توالی شده در سال های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴ میلادی از استان خراسان رضوی و ویروس های تیپ O ایران و کشور های همسایه (ویروس های O که در بررسی حاصل از BLAST در NCBI از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA

1. O-As1-IR-KR-2020	27. KJ831687.1 - O isolate IRN/30/2010
2. O-As2-IR-KR-2020	28. KY091282.1 O- IRN/88/2009
3. O-Ni-IR-KR-2020	29. KJ831691.1 O -IRN/187/2010
4. MN539142.1 -O-vacc-O/IRN/93/2016	30. KJ831690.1 - O - IRN/174/2010
5. HQ663879.1-KhR-Sho-O-Iran/1/2010	31. KJ831689.1 -O - IRN/89/2010
6. JN652665.1-O/IRN/1/2010-KhR-Zibaei-Ahm	32. KJ831688.1 - -O isolate IRN/33/2010
7. HQ450646.1O-KhR-Sho-zibaei	33. KJ606977.1 - O isolate AFG/41/2011
8. HQ450645.1-O KhR-Zibaei-2010	34. JN676146.1 F -O/IRN/1/2010
9. JF916987.1-O-KhR-Zibaei-O/IRN/100/2010	35. JQ321837.1 -O - 2006/Shazand/Markazi
10. JF916986.1KhR-zibaei-O/IRN/246/2010	36. DQ767863.1- O - Ir 07
11. JF916985.1 KhR-Zibaei-O/IRN/2/2010	37. DQ767864.1 - O- Ir 08 -
12. HQ663880.1-KhR-Zibaei-Shok-Iran/1/2010	38. EF090942.1 - O- IRN-2/05
13. A11-KHR3 2013-01-O	39. KJ606980.1 - O- IRN/11/2006
14. A11-KHR3 2013-01-O	40. MN547618.1 - O- IR/P50/2016
15. A11-N-F3-KHR-01-O	41. MG518622.1 - O - O2016 Iran
16. B10-N-G-Gp-02-KHR-O	42. KR149716.1- O/IRN/8/2005
17. B11-KHR4-02-O	43. KR149715.1 - O/IRN/31/2010
18. B11-N-F4-KHR-O 02	44. JN676146.1 - O/IRN/1/2010
19. C11-N-F5KHR-O-2 03	45. MK814882.1 - O - PanAsia
20. G06-p6-NP4-KHR-2012-10-26-O	46. MK814881.1 - O strain PanAsia
21. MK292143.1 - O/VRI/CAMB/SAHIWAL1/PUN/PAK	47. AY149620.1 - O
22. MH085208.1- O/NIAB/PUN/PAK/226/2017	48. EF600685.1 - O/IRN/05
23. MH085205.1- O isolate O/NIAB/PUN/PAK/220/2017	49. MN296507.1-O isolate O/EGY/H1/2017
24. MH085204.1 - O/NIAB/PUN/PAK/218/2017	50. MN296508.1 O/EGY/H2/2017
25. MH085206.1 -O/NIAB/PUN/PAK/222/2017	51. MB483971.1 JP 2019213523-
26. JX040498.1- O isolate TUR/1086/2010	52. M15981.1 O-variant VP1
	53. MK292142.2-O/VRI/CAMB/PUN/PAK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1. O-A ₁ -JR-KR		0.018	1.205	1.190	0.971	1.397	1.212	0.971	0.945	0.954	0.945	1.233	1.423	1.423	0.113	1.416	1.434	0.125	0.109	1.158	0.903	0.903	0.910	
2. O-A ₂ -JR-KR			1.224	1.217	0.925	1.399	1.265	0.925	0.902	0.913	0.902	1.257	1.423	1.423	0.133	1.358	1.434	0.139	0.109	1.191	0.917	0.917	0.925	
3. O-Ni-JR-KR-2				0.087	0.936	1.086	0.078	0.936	0.925	0.936	0.915	1.321	1.176	1.176	1.260	1.214	1.132	1.239	1.121	1.234	0.947	0.947	0.940	
4. MN539142.1					0.983	1.062	0.046	0.983	0.974	0.983	0.955	1.315	1.134	1.134	1.202	1.181	1.102	1.191	1.093	1.127	0.964	0.964	0.957	
5. HQ663879.1						0.959	0.972	0.000	0.014	0.011	0.020	1.048	1.325	1.325	0.912	1.288	1.349	0.947	0.912	0.989	0.041	0.041	0.041	
5. JN652665.1-C							1.193	0.959	0.948	0.948	0.960	1.298	1.291	1.291	1.351	1.297	1.261	1.355	1.299	1.254	0.931	0.946	0.932	
7. HQ450646.1C								0.972	0.962	0.972	0.943	1.328	1.189	1.189	1.254	1.181	1.162	1.242	1.121	1.188	0.966	0.966	0.959	
8. HQ450645.1									0.014	0.011	0.020	1.048	1.325	1.325	0.912	1.288	1.349	0.947	0.912	0.989	0.041	0.041	0.041	
9. JF916987.1-O										0.008	0.014	1.033	1.325	1.325	0.901	1.270	1.349	0.938	0.913	0.970	0.041	0.041	0.041	
10. JF916986.1K											0.008	1.041	1.325	1.325	0.891	1.276	1.349	0.929	0.895	0.980	0.044	0.044	0.044	
11. JF916985.1 K												1.048	1.325	1.325	0.901	1.276	1.349	0.938	0.895	0.989	0.049	0.049	0.049	
12. HQ663880.1													1.336	1.336	1.195	1.316	1.369	1.178	1.122	1.256	1.036	1.026	1.021	
13. A11-KHR3 2														0.000	1.425	0.516	0.000	1.422	1.403	1.445	1.387	1.387	1.408	
14. A11-KHR3 2																1.425	0.516	0.000	1.422	1.403	1.445	1.387	1.387	1.408
15. A11-N-F3-K																	1.444	1.422	0.000	0.006	1.123	0.843	0.859	0.851
16. B10-N-G-Gg																		0.557	1.431	1.305	1.310	1.238	1.232	1.255
17. B11-KHR4-0																			1.433	1.382	1.400	1.381	1.381	1.404
18. B11-N-F4-K																				0.006	1.133	0.837	0.852	0.845
19. C11-N-F5KH																					1.042	0.846	0.869	0.858
20. G06-p6-NP4																						0.979	0.970	0.970
21. MK292143.1																							0.005	0.007
22. MH085208.1																								0.009
23. MH085205.1																								
24. MH085204.1																								
25. MH085206.1																								

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
1. O-A ₁ -JR-KR	0.910	0.903	1.355	0.884	0.884	0.891	0.884	0.884	0.884	0.884	0.884	0.928	0.136	0.122	1.267	0.867	1.278	0.917	0.863	0.889	0.884	1.371	1.094
2. O-A ₂ -JR-KR	0.925	0.917	1.357	0.911	0.911	0.911	0.904	0.911	0.911	0.904	0.911	0.938	0.145	0.111	1.268	0.890	1.241	0.939	0.881	0.917	0.911	1.415	1.091
3. O-Ni-JR-KR-2	0.940	0.940	1.196	0.931	0.931	0.931	0.938	0.931	0.931	0.923	0.931	0.925	1.267	1.161	0.905	0.902	0.087	0.953	0.908	0.917	0.931	1.107	1.169
4. MN539142.1	0.957	0.957	1.228	0.956	0.956	0.963	0.970	0.956	0.956	0.956	0.956	0.950	1.285	1.126	0.793	0.943	0.002	0.984	0.948	0.969	0.956	1.135	1.219
5. HQ663879.1	0.041	0.041	0.986	0.011	0.011	0.013	0.013	0.011	0.011	0.016	0.011	0.068	0.982	0.700	1.003	0.027	1.031	0.071	0.035	0.011	0.011	1.004	0.921
5. JN652665.1-C	0.939	0.946	1.020	0.967	0.967	0.967	0.974	0.967	0.967	0.967	0.967	1.013	1.244	1.190	1.102	0.954	1.075	0.946	0.952	0.967	0.967	0.065	1.303
7. HQ450646.1C	0.959	0.959	1.277	0.943	0.943	0.950	0.957	0.943	0.943	0.943	0.943	0.959	1.268	1.160	0.830	0.944	0.042	0.971	0.950	0.956	0.943	1.119	1.200
8. HQ450645.1	0.041	0.041	0.986	0.011	0.011	0.013	0.013	0.011	0.011	0.016	0.011	0.068	0.982	0.700	1.003	0.027	1.031	0.071	0.035	0.011	0.011	1.004	0.921
9. JF916987.1-O	0.041	0.041	0.977	0.005	0.005	0.008	0.013	0.005	0.005	0.011	0.005	0.068	0.974	0.736	1.003	0.021	1.015	0.071	0.024	0.005	0.005	0.995	0.904
10. JF916986.1K	0.044	0.044	0.977	0.008	0.008	0.011	0.016	0.008	0.008	0.008	0.008	0.068	0.965	0.700	1.012	0.019	1.023	0.068	0.027	0.008	0.008	0.995	0.921
11. JF916985.1 K	0.049	0.049	0.995	0.013	0.013	0.016	0.021	0.013	0.013	0.013	0.013	0.074	0.982	0.736	0.994	0.024	0.998	0.068	0.033	0.013	0.013	1.004	0.929
12. HQ663880.1	1.031	1.031	1.300	1.015	1.015	1.020	1.020	1.015	1.015	1.025	1.015	1.083	1.234	1.107	1.346	1.010	1.324	1.041	1.024	1.011	1.015	1.333	1.328
13. A11-KHR3 2	1.397	1.397	1.111	1.364	1.364	1.364	1.353	1.364	1.364	1.364	1.364	1.398	1.460	1.425	0.923	1.364	1.134	1.409	1.376	1.364	1.364	1.322	1.393
14. A11-KHR3 2	1.397	1.397	1.111	1.364	1.364	1.364	1.353	1.364	1.364	1.364	1.364	1.398	1.460	1.425	0.923	1.364	1.134	1.409	1.376	1.364	1.364	1.322	1.393
15. A11-N-F3-K	0.851	0.851	1.319	0.821	0.821	0.829	0.837	0.821	0.821	0.821	0.821	0.886	0.092	0.087	1.314	0.810	1.278	0.859	0.837	0.826	0.821	1.340	1.106
16. B10-N-G-Gg	1.244	1.244	1.154	1.238	1.238	1.244	1.244	1.238	1.238	1.255	1.238	1.249	1.499	1.370	1.230	1.255	1.239	1.299	1.272	1.238	1.238	1.261	1.325
17. B11-KHR4-0	1.392	1.392	1.185	1.356	1.356	1.356	1.344	1.356	1.356	1.356	1.356	1.381	1.476	1.344	0.872	1.356	1.102	1.405	1.369	1.356	1.356	1.307	1.376
18. B11-N-F4-K	0.845	0.845	1.343	0.816	0.816	0.824	0.831	0.816	0.816	0.816	0.816	0.879	0.096	0.100	1.319	0.805	1.277	0.852	0.831	0.821	0.816	1.336	1.116
19. C11-N-F5KH	0.858	0.846	1.308	0.838	0.838	0.838	0.850	0.838	0.838	0.826	0.838	0.900	0.054	0.068	1.341	0.815	1.093	0.866	0.846	0.838	0.838	1.278	1.044
20. G06-p6-NP4	0.979	0.970	1.419	0.968	0.968	0.968	0.968	0.968	0.968	0.950	0.968	0.986	1.184	0.917	1.293	0.975	1.136	0.964	0.959	0.968	0.968	1.234	1.310
21. MK292143.1	0.004	0.005	0.936	0.032	0.032	0.030	0.036	0.032	0.032	0.036	0.032	0.065	0.933	0.877	0.975	0.040	0.990	0.064	0.052	0.034	0.032	0.974	0.894
22. MH085208.1	0.005	0.007	0.943	0.034	0.034	0.032	0.034	0.034	0.034	0.038	0.034	0.065	0.953	0.903	0.975	0.042	0.990	0.066	0.052	0.036	0.034	0.988	0.887
23. MH085205.1	0.007	0.009	0.963	0.036	0.036	0.034	0.040	0.036	0.036	0.040	0.036	0.071	0.940	0.890	0.993	0.040	0.983	0.064	0.052	0.038	0.036	0.988	0.906

MX: Pairwise Distances (O-As1+As2+Ni+Old-KRNalign+ KOL-OK-Okfas)

FileDisplayAverageCaptionHelp

<

MX: Pairwise Distances (O-As1+As2+Ni+Old-KRNAIalign+ KOL-OK-Ok.fas)																							
	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	
26. JX040498.1-	0.941	0.955	0.941	0.983	1.335	1.201	1.038	0.956	1.228	0.954	0.975	0.953	0.941	1.079	1.275	0.041	1.043	0.935	0.965	1.105	1.225	0.943	
27. KJ831687.1-	0.000	0.007	0.000	0.063	0.901	0.864	0.932	0.019	0.982	0.058	0.030	0.002	0.000	1.008	0.892	0.973	0.942	0.093	0.088	0.224	0.783	0.030	
28. KY091282.1	0.000	0.007	0.000	0.063	0.901	0.864	0.932	0.019	0.982	0.058	0.030	0.002	0.000	1.008	0.892	0.973	0.942	0.093	0.088	0.224	0.783	0.030	
29. KJ831691.1 O	0.005	0.009	0.005	0.061	0.908	0.864	0.945	0.017	0.989	0.056	0.028	0.007	0.005	1.008	0.886	0.960	0.954	0.093	0.088	0.227	0.783	0.028	
30. KJ831690.1-	0.011	0.015	0.011	0.067	0.915	0.864	0.938	0.026	0.995	0.058	0.036	0.013	0.011	1.015	0.892	0.980	0.948	0.093	0.088	0.217	0.783	0.034	
31. KJ831689.1-	0.000	0.007	0.000	0.063	0.901	0.864	0.932	0.019	0.982	0.058	0.030	0.002	0.000	1.008	0.892	0.973	0.942	0.093	0.088	0.224	0.783	0.030	
32. KJ831688.1-		0.007	0.000	0.063	0.901	0.864	0.932	0.019	0.982	0.058	0.030	0.002	0.000	1.008	0.892	0.973	0.942	0.093	0.088	0.224	0.783	0.030	
33. KJ606977.1-			0.007	0.065	0.901	0.864	0.945	0.019	0.989	0.058	0.030	0.009	0.007	1.008	0.898	0.987	0.954	0.095	0.091	0.220	0.795	0.034	
34. JN676146.1				0.063	0.901	0.864	0.932	0.019	0.982	0.058	0.030	0.002	0.000	1.008	0.892	0.973	0.942	0.093	0.088	0.224	0.783	0.030	
35. JQ321837.1-					0.977	0.936	0.981	0.063	0.970	0.092	0.067	0.065	0.063	1.037	0.919	1.028	0.985	0.089	0.087	0.238	0.757	0.065	
36. DQ767863.1					0.057	1.324	0.884	1.351	0.920	0.901	0.906	0.901	1.243	1.150	1.322	1.333	0.881	0.911	1.034	1.284	0.940		
37. DQ767864.1						1.288	0.837	1.192	0.873	0.837	0.864	0.864	1.246	0.998	1.201	1.288	0.769	0.854	1.039	1.290	0.890		
38. EF090942.1-							0.946	0.802	0.963	0.945	0.943	0.932	1.217	1.219	1.044	0.013	1.012	0.994	1.113	1.262	0.975		
39. KJ606980.1-								0.982	0.048	0.015	0.020	0.019	1.002	0.903	0.988	0.962	0.088	0.084	0.209	0.771	0.038		
40. MN547618.1									1.015	0.969	0.994	0.982	1.142	1.219	1.256	0.802	0.946	0.932	1.107	1.207	0.990		
41. MG518622.1										0.062	0.060	0.058	1.002	0.881	0.983	0.967	0.108	0.105	0.207	0.752	0.062		
42. KR149716.1-										0.032	0.030	0.001	0.913	1.006	0.961	0.083	0.082	0.209	0.771	0.050			
43. KR149715.1											0.002	0.995	0.896	0.985	0.953	0.096	0.091	0.219	0.793	0.032			
44. JN676146.1													1.008	0.892	0.973	0.942	0.093	0.088	0.224	0.783	0.030		
45. MK814882.1															1.310	1.078	1.235	1.006	0.996	1.131	1.189	0.981	
46. MK814881.1																1.285	1.191	0.906	0.898	1.054	1.247	0.894	
47. AV149620.1																	1.049	0.955	0.984	1.124	1.231	0.992	
48. EF606885.1-																		1.009	0.991	1.109	1.243	0.984	
49. MN296507.1																			0.000	0.226	0.742	0.088	
50. MN296508.1																				0.228	0.744	0.084	
51. MB483971.1																					0.870	0.225	
52. M15981.1 O																						0.724	
53. MK292142.2																							

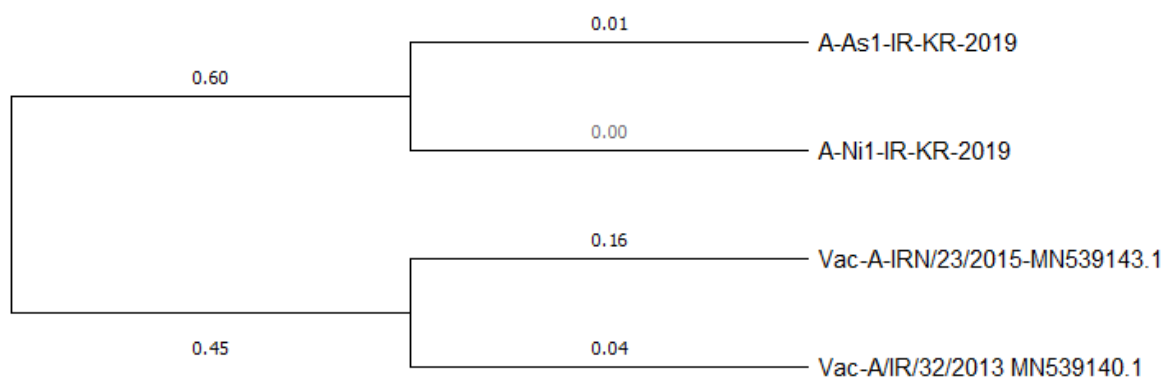
۹-۴- نتایج حاصل از بررسی فیلوژنی:

دندروگرام فیلوژنتیک ویروس‌های تعیین سکانس شده بر اساس قرابت اسیدهای نوکلئیک آنها با سایر ویروس‌های هم تیپ توسط نرم افزارهای **BioEdit** و **MEGA** رسم گردید.

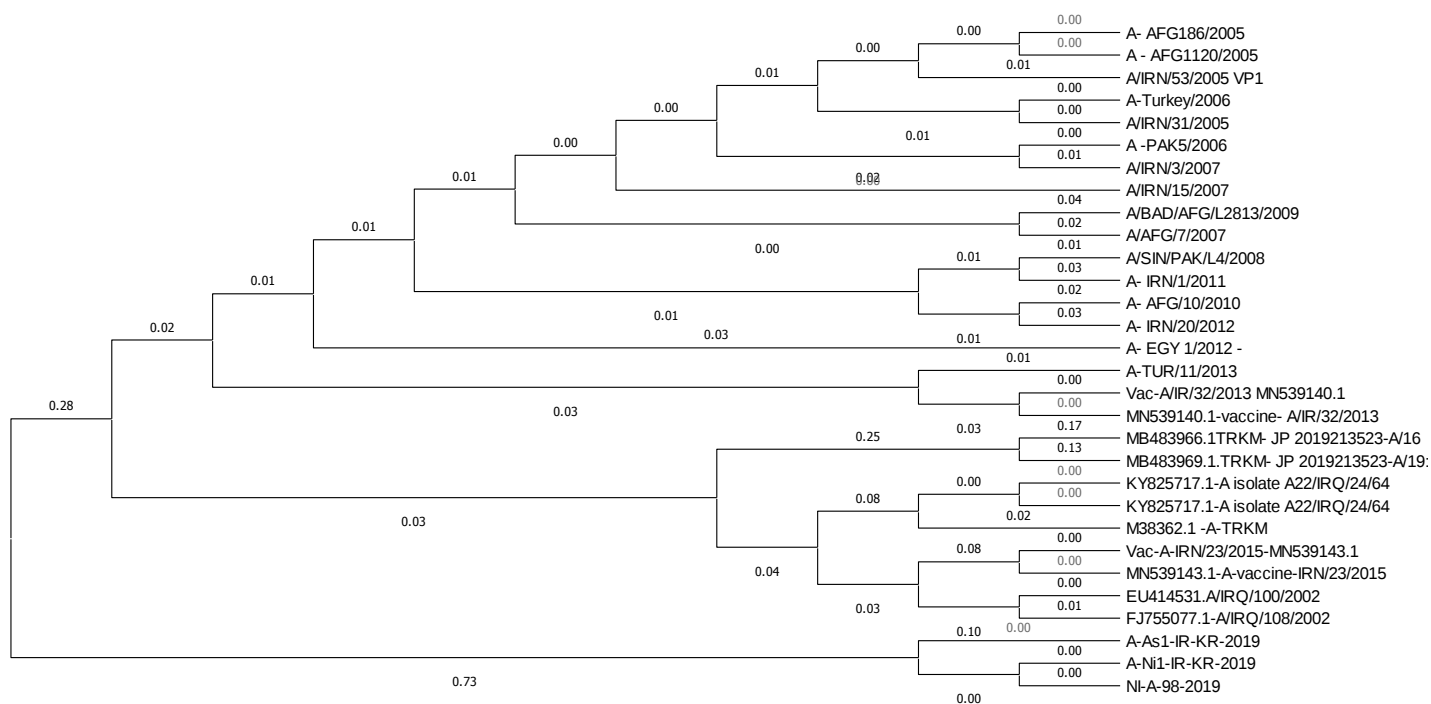
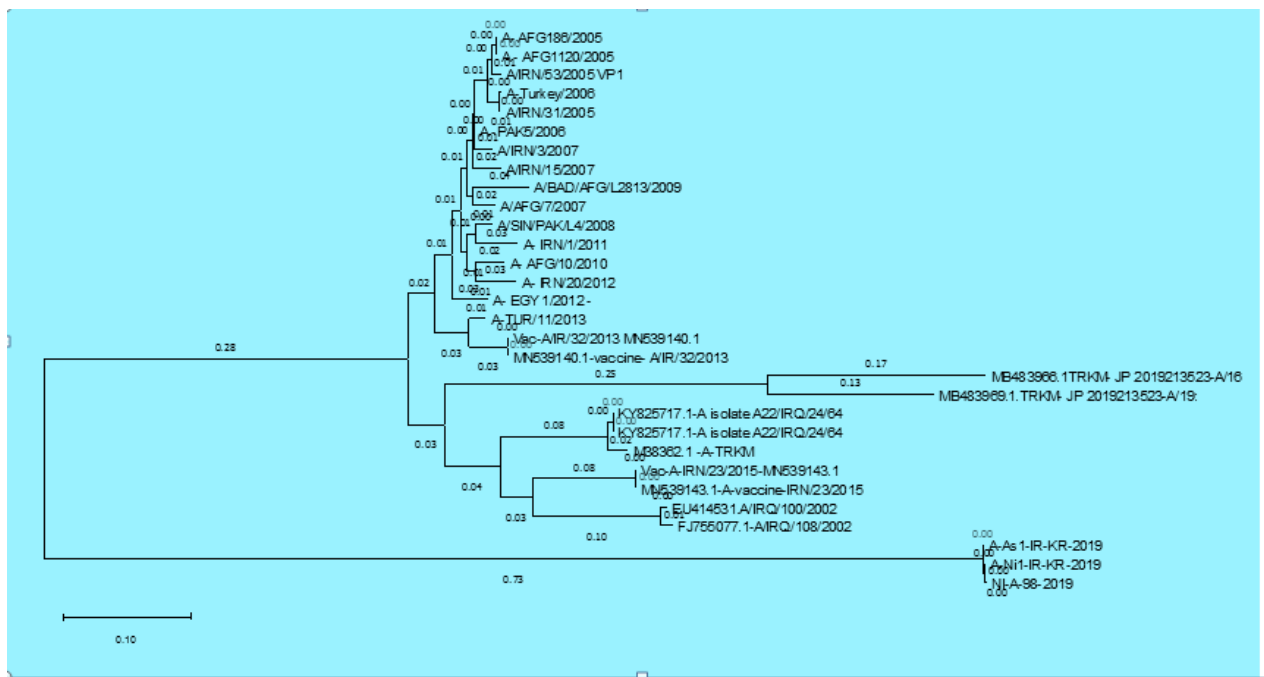


0.1

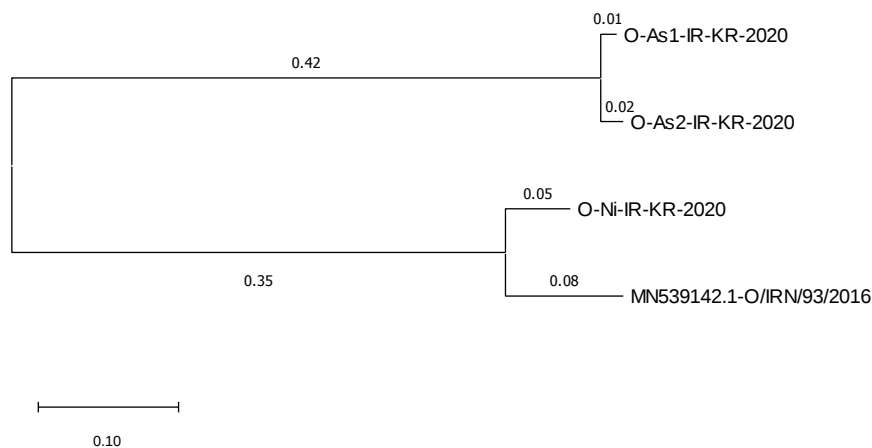
دندروگرام ۹-۴-۱- رسم نمودار فیلوژنتیک ویروس‌های تب برفکی تیپ **A** جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹ و مقایسه آنها با ویروس‌های تب برفکی تیپ **A** واکسن ساخته شده در ایران ثبت شده در **NCBI** با نرم افزار **BioEdit**



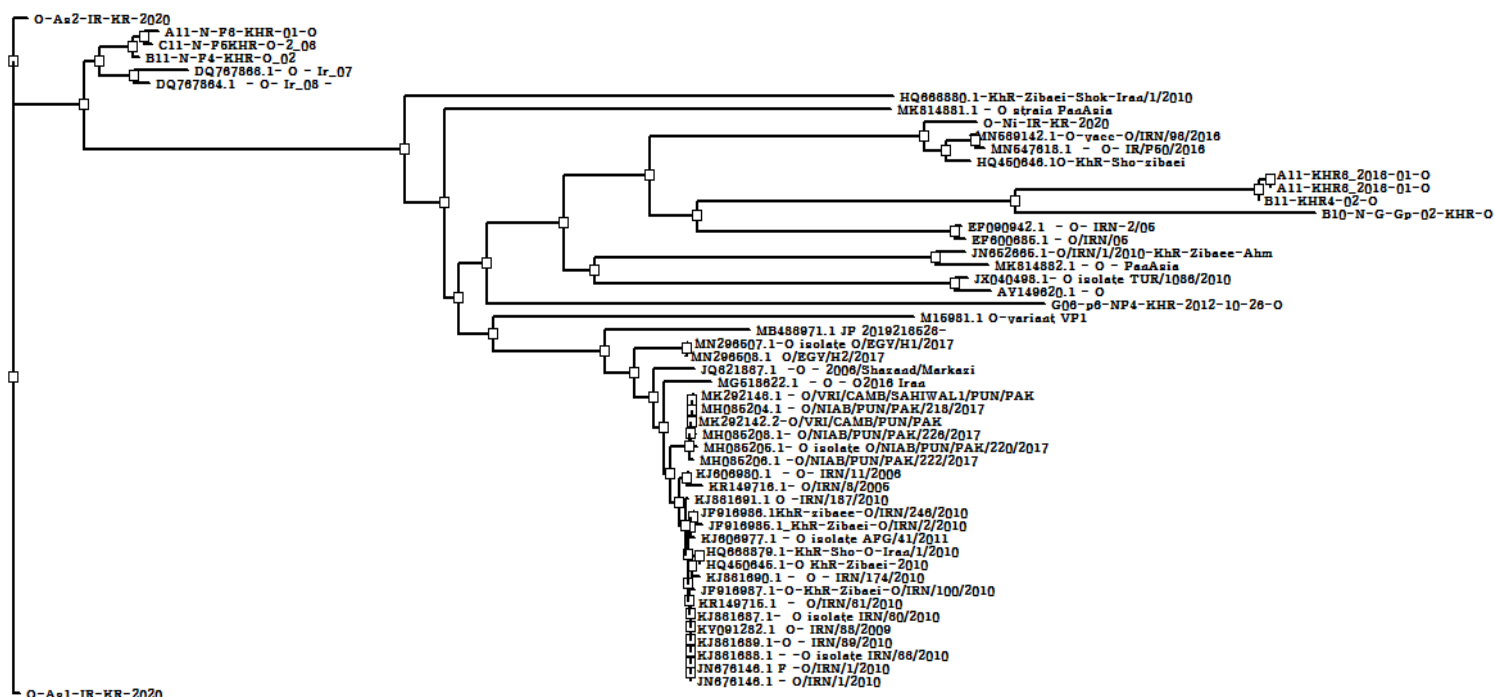
دندروگرام ۴-۹-۲- رسم نمودار فیلوژنتیک ویروس‌های تب برفکی تیپ A جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹ و مقایسه آنها با ویروس‌های تب برفکی تیپ A واکسن ساخته شده در ایران ثبت شده در NCBI با نرم افزار MEGA



دندوگرام ۴-۹-۳- رسم نمودار فیلوژنتیک ویروس‌های تب برفکی تیپ **A** جدا شده از خراسان رضوی در سال ۱۳۹۸ و مقایسه آنها با سایر ویروس‌های تب برفکی تیپ **A** منطقه (نرم افزار MEGA)



دندروگرام ۴-۹-۴- رسم نمودار فیلوژنتیک ویروس‌های تب برفکی تیپ **O** جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹ و مقایسه آنها با ویروس تب برفکی تیپ **O** واکسن ساخت ایران ثبت شده NCBI با نرم افزار MEGA



1

دندروگرام ۴-۹-۵- رسم نمودار فیلوژنتیک ویروس های تب برفکی تیپ O جدا شده از

استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۹ و مقایسه آنها با ویروس های تب برفکی تیپ O منطقه

ثبت شده در NCBI با نرم افزار BioEdit

بررسی مولکولار اپیدمیولوژی ویروس های در گردش تب برفکی و مقایسه قرابت آنتی ژنیسته آن با ویروسهای واکسینال در استان خراسان رضوی

۴-۱۰- نتایج حاصل از بررسی قرابت آنتی ژنیسته ویروس های جدا شده از استان

خراسان رضوی در سال های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ ویروس های رفرنس واکسینال (ویروس

های بکار رفته در واکسن)

با توجه به نتایج کشت سلولی و جدا سازی ویروس تیپ **O** در کشت سلول و عدم جدا سازی تیپ های **A** و **Asia1** بررسی قرابت آنتی ژنیسته بر روی سه ویروس تیپ **O** جدا شده از استان خراسان رضوی انجام شد . ۶ نمونه از نمونه هایی که در کشت سلولی رشد داشتند قدرت رشد مجدد یافتند که از این تعداد تنها سه نمونه در پاساژهای بعدی جهت تعیین تیترو ویروس فعالیت از خود نشان دادند . نتایج حاصل از آزمایش دو بعدی خنثی سازی ویروس

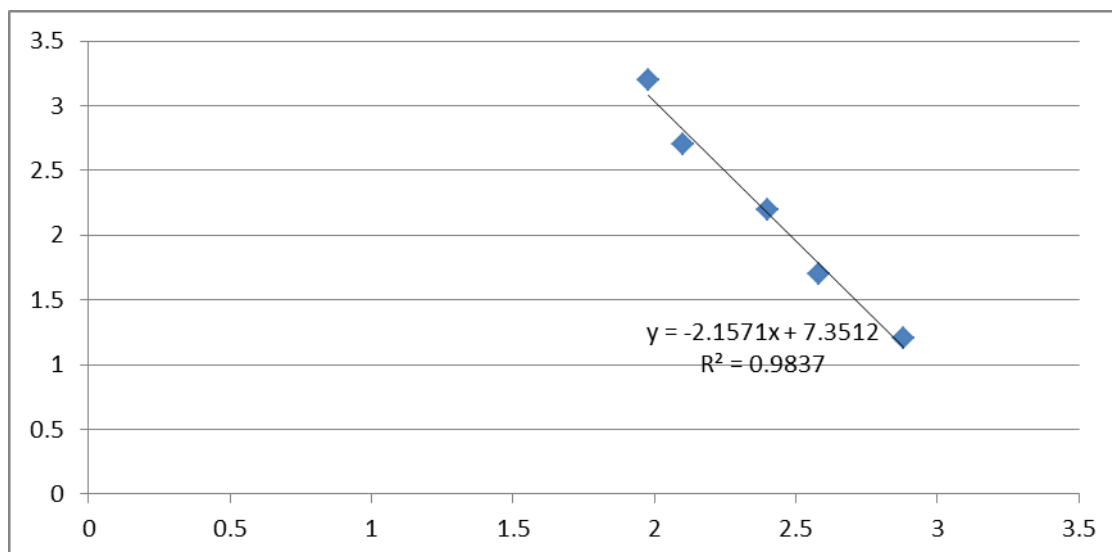
(Two Dimensional Virus Neutralisation Test) بر روی این ویروس های جدا

سازی شده نشان می دهد که در هر سه مورد محاسبه ضریب شباهت آنتی ژنیته ویروس در گردش با ویروس واکسن **Relationship value (r-value)** بزرگتر از ۰/۳ می باشد . این امر حاکی از آن است که واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدرت تولید آنتی بادی محافظتی و ایجاد ایمنی لازم در برابر بیماری تب برفکی را داشته است و تا زمانی که میزان اختلاف آنتی ژنیستی ویروس های در گردش در استان خراسان رضوی با ویروس رفرنس در اثر موتاسیون های ویروسی و یا انتقال ویروس از کشور ها و یا استانهای همسایه بیشتر از ۰/۳ نشده باشد تزریق واکسن یاد شده برای کنترل بیماری تب برفکی مناسب خواهد بود

(جداول ۴-۱۰-۱، ۴-۱۰-۲، ۴-۱۰-۳)

۴-۱۰-۱- نتایج حاصل از بررسی قرابت آنتی ژنیسته ویروس تیپ **O** استان خراسان رضوی با ویروس تیپ **O** بکار رفته در واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

VNT titer	Virus titer
1.98	3.2
2.1	2.7
2.4	2.2
2.58	1.7
2.88	1.2

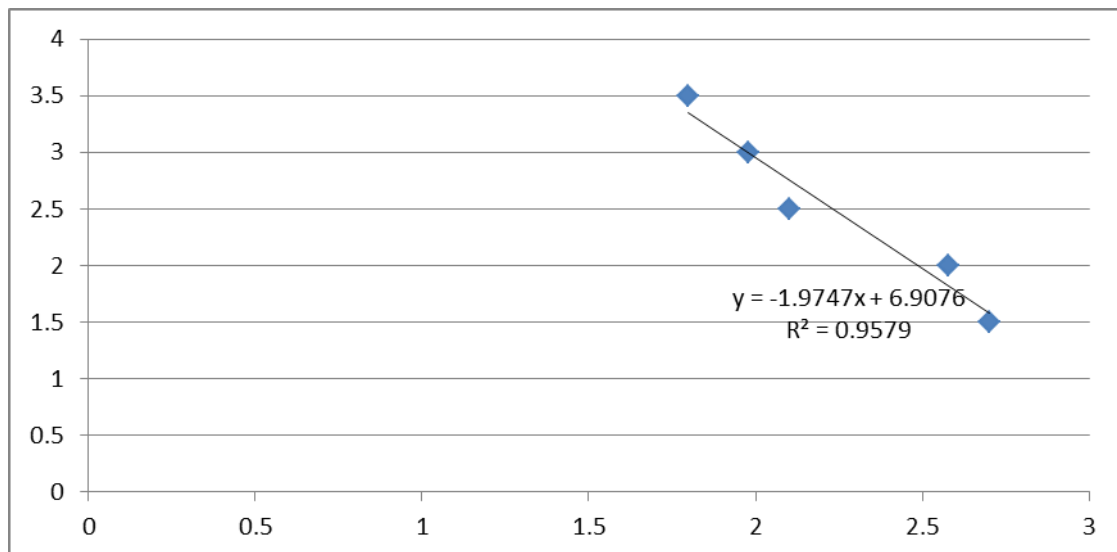


نمودار ۴-۱۰-۱- نتایج حاصل از آزمایش خنثی سازی ویروس تیپ O استان خراسان رضوی با ویروس تیپ O بکار رفته در واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

جدول ۴-۱۰-۲- نتایج حاصل از بررسی قرابت آنتی ژنیسیته ویروس تیپ O استان خراسان رضوی (جدا شده از گاو شهر مشهد) در سال های ۱۳۹۹ با ویروس تیپ O بکار رفته در واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

r1 value	Antilog=r1 value	Difference	تیترو ویروس واکسن تیپ O	تیترو ویروس تیپ O جدا شده
r1>0.3	۰/۷۲۴۴	-۰/۱۴	۳/۱	۲/۹۶

VNT titre	Virus titre
1.8	3.5
1.98	3
2.1	2.5
2.58	2
2.7	1.5

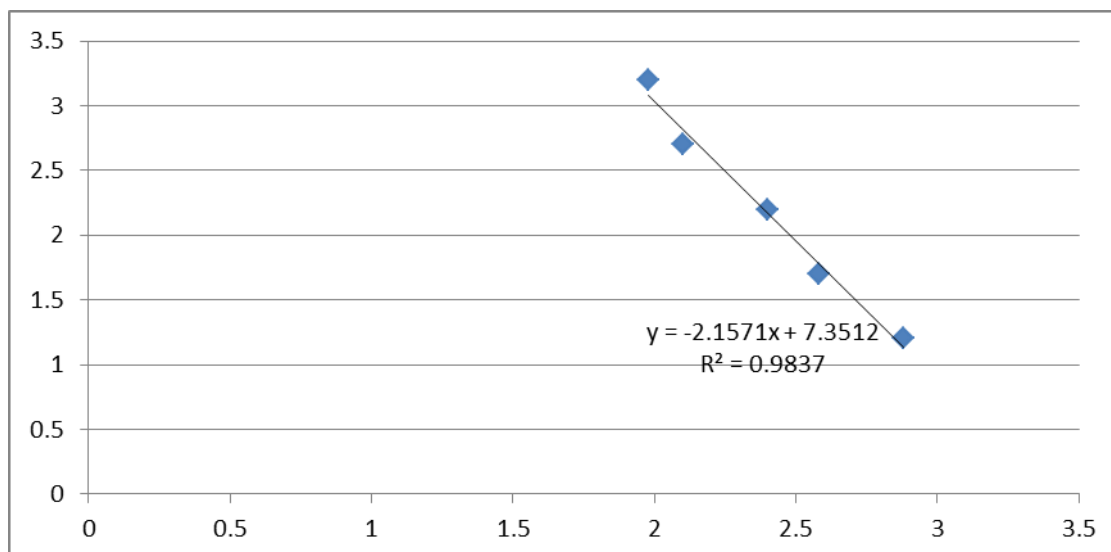


نمودار ۴-۱۰-۲- نتایج حاصل از آزمایش خنثی سازی ویروس تیپ O استان خراسان رضوی (جدا شده از گاو شهر مشهد) در سال های ۱۳۹۹ با ویروس تیپ O بکار رفته در واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

جدول ۴-۱۰-۳- نتایج حاصل از بررسی قرابت آنتی ژنیسته ویروس تیپ O استان خراسان رضوی (جدا شده از گوسفند شهر سبزوار) در سال های ۱۳۹۹ با ویروس تیپ O بکار رفته در واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

r1 value	Antilog=r1 value	Difference	تیتر ویروس واکسن تیپ O	تیتر ویروس تیپ O جدا شده
r1>0.3	۰/۸۱۲۸	-۰/۰۹	۳/۱	۳/۰۱

VNT titer	Virus titer
1.98	3.2
2.1	2.7
2.4	2.2
2.58	1.7
2.88	1.2



نمودار ۴-۱۰-۳- نتایج حاصل از آزمایش خنثی سازی ویروس تیپ O استان خراسان رضوی (جدا شده از گاو شهر تربت حیدریه) در سال های ۱۳۹۹ با ویروس تیپ O بکار رفته در واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

جدول ۹-۳- نتایج حاصل از بررسی قرابت آنتی ژنیسته ویروس تیپ O استان خراسان رضوی (جدا شده از گاو شهر تربت حیدریه) در سال های ۱۳۹۹ با ویروس تیپ O بکار رفته در واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

r1 value	Antilog=r1 value	Difference	تیترو ویروس واکسن تیپ O	تیترو ویروس تیپ O جدا شده
r1>0.3	۰/۷۹۴۳	-۱/۰۰	۳/۱	۳/۰۰

۵- بحث و نتیجه گیری:

بیماری تب برفکی یک بیماری بسیار عفونی و بشدت واگیر دام می باشد. ضایعات اقتصادی و هزینه های درمانی و غیر اقتصادی شدن دام های مبتلاء سبب شده است تا این بیماری دشمن دام و سرمایه دامی لقب گیرد (۱۲). بدلیل ماهیت واگیری بسیار بالای بیماری (۱۰۰٪) سرعت تشخیص آن در سیاست گذاری کنترل و مبارزه جایگاهی ویژه دارد (۳۵). در این بررسی که طی ۱۲ ماه انجام گرفت با استفاده از آزمایش های الیزا **Real Time PCR** و جداسازی ویروس (کشت سلولی) نمونه های مشکوک به تب برفکی مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین در طول آزمایش دو ویروس تیپ **A** و سه ویروس تیپ **O** از نظر اسید های نوکلئیک تعیین توالی شدند. در طرح حاضر از تعداد ۱۶۸ نمونه ارسالی به آزمایشگاه ۸۶ نمونه متعلق به گاو و ۸۲ نمونه متعلق به گوسفند بود. که از ۱۰۳ نمونه مثبت ۱۰۲ نمونه با استفاده از آزمایش **Real Time PCR** مثبت تشخیص داده شد و تنها یک نمونه از نظر آزمایش الیزا مثبت و از نظر آزمایش **Real Time PCR** منفی تشخیص داده شده است. اما با آزمایش الیزا ۸۸ نمونه از ۱۶۸ نمونه ارسالی مثبت بودند که ۱۴ نمونه از نظر آزمایش **Real Time PCR** مثبت بوده ولی در آزمایش الیزا منفی تلقی می شوند. این موضوع بیانگر این واقعیت است که با توجه به گران بودن کیت الیزا در شرایط حاضر می توان از آزمایش **Real Time PCR** بعنوان جایگزین آزمایش الیزا برای تشخیص تب برفکی استفاده نمود.

آزمایش جدا سازی ویروس برروی کشت سلولی یکی از معتبرترین آزمایش های تشخیصی است. اما این آزمایش نیز مشکلات خاص خود را دارد. در این مطالعه ۳۴/۵۲ درصد نمونه های مشکوک با این آزمایش مثبت تشخیص داده شدند. که از این تعداد ۳۳/۳۳ درصد متعلق به گوسفند و ۳۵/۷۲ درصد متعلق به گاو می باشد. با توجه به گزارش منتشر شده در آزمایشگاه رفرنس جهانی (WRL) ۲۰ تا ۳۰ درصد از نمونه های مشکوک در کشت سلولی مثبت

می‌شوند (۵۶). اینکه چرا با توجه به حساسیت زیاد کشت سلولی درصد زیادی از نمونه‌ها منفی تلقی می‌شوند دلایل زیادی دارد. یکی از دلایل، حساسیت ویروس تب برفکی به تغییرات pH و حرارت بالا است، که ممکن است در اثر نگهداری طولانی مدت تامپون، pH آن تغییر نماید و یا به هنگام ارسال یا آماده‌سازی، نمونه در معرض حرارت بالا قرار گیرد. همچنین تعدادی از دامداران بخصوص در روستاها بیماری را بخوبی می‌شناسند و اقدام به درمان با مواد اسیدی می‌نمایند که این امر موجب از بین رفتن ویروس می‌گردد. نتایج بدست آمده در این سری از آزمایشات با گزارش دیگر محققین هم سو می‌باشد (۳،۷،۸،۹،۱۰،۲۱). اینکه چرا بعضی از نمونه‌های مثبت FMD که بوسیله الیزا و Real Time PCR مورد تأیید قرار گرفته‌اند در کشت سلولی تأیید نمی‌شوند کاملاً معلوم نیست. Kitching و همکاران (۲۰۰۲) و نیز Zhang و همکاران (۲۰۰۳) اعتقاد دارند آنتی‌ژن و RNA شناسائی شده در الیزا و RT-PCR الزاماً بیانگر وجود ویروس عفونی نیست و ممکن است ویروس‌های گرفته شده با آزمایش الیزا مثبت تشخیص داده شوند اما در کشت سلولی رشد ننمایند، آزمایش الیزا از حساسیت و اختصاصیت بالا برخوردار است. این آزمایش می‌تواند هم زمان تیپ‌های ویروس تب برفکی را نیز تشخیص داده ولی ویروسی که قدرت رشد در کشت سلولی را دارد بطور کامل یا نسبی بوسیله عوامل فیزیکی از بین رفته باشد. (۲،۸۷) Real Time PCR و RT-PCR آزمایشی است که توانائی شناسائی مقادیر اندک ژنوم ویروسی موجود در نمونه را دارد و می‌تواند به عنوان جایگزین سریع و ساده برای آزمایش کشت سلولی مطرح شود (۱،۳،۷). آزمایش جداسازی ویروس بر روی کشت سلولی آزمایشی معتبر است. اما با توجه به وقت‌گیر بودن و نیز هزینه بالا، انجام این آزمایش مشکل‌ساز بوده و همچنین نیاز به تجهیزات اختصاصی و تجربه زیاد دارد.

آزمایش الیزا هم اکنون یکی از مهمترین و معتبرترین آزمایش‌های تشخیصی برای تب برفکی است. این روش تشخیصی روشی مناسب می‌باشد اما خرید کیت خارج از کشور نه تنها

ارزبر و گران است بلکه وابستگی را نیز به همراه دارد. لذا باید سعی گردد تا کیت مناسب جهت انجام آزمایش الیزا در کشور طراحی شود. در این تحقق با بدست آوردن ضریب کاپا برای توزیع فراوانی مطلق و توامان نتایج دو آزمایش با هم نتیجه گرفته شد که از **Real Time PCR** می توان بجای الیزا استفاده نمود اما این نتیجه گیری که بجای استفاده از کیت الیزا می توان از روش تشخیص مولکولی استفاده نمود مورد توافق (**Reid** و همکاران ۱۹۹۸) نمی باشد. نتیجه بدست آمده توسط (**Reid** و همکاران ۲۰۰۱) مؤید این نظر است که تشخیص تب برفکی با استفاده از پرایمر-های **Universal** از حساسیت مناسب برخوردار است ولی تعیین تیپ ویروس با پرایمرهای اختصاصی بخوبی انجام نمی گیرد.

در مطالعه زیبایی و همکاران در سال ۱۳۸۵ نتیجه بدست آمده نشان می دهد که از آزمایش **RT-PCR** برای تشخیص نمونه های مشکوک ۴۶ درصد است که در مقایسه با الیزا بعنوان آزمایش معتبر بیانگر مناسب بودن این روش آزمایش می باشد (۷). امروزه در آزمایشگاه رفرنس جهانی تب برفکی (**WRL**) از آزمایش های تشخیص ژنی همراه با الیزا و جدا سازی ویروس بعنوان آزمایش های تشخیصی استفاده می گردد (۵۶).

در حال حاضر توصیه می گردد از روش تشخیصی **RT-PCR** بعنوان روش تکمیلی در کنار سایر روش های معتبر نظیر **Real Time PCR**، الیزا و کشت سلولی استفاده شود. بخصوص اینکه با استفاده از **RT-PCR** و تعیین ترادف اسیدهای نوکلئیک ویروس مورد نظر (عمدتا ناحیه **1D** ژنوم ویروس) و مقایسه با نقاط مشابه از ژنوم ویروس هایی که در منطقه شناسائی شده اند می توان به شباهت و اختلاف آنها و نیز با رسم درخت فیلوژنتیک آنها به منشاء احتمالی عفونت پی برد. پس از شناسائی و تعیین تیپ ویروس نمونه های مشکوک در استان خراسان رضوی دو ویروس تیپ **A** و سه ویروس تیپ **O** جهت انجام مطالعات ژنومی تعیین توالی شدند.

تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک از انتهای ناحیه **1D** ویروس تب برفکی سویه های **O** و **A** با توالی مشابه از ژنوم برخی از ویروس های استان خراسان رضوی، ایران و کشورهای همسایه موجود در بانک ژن (**Gene bank**) مقایسه گردید.

ویروس تب برفکی تیپ **O** بیشترین ویروسی است که از نمونه های ارسالی به آزمایشگاه رفرنس جهانی **WRL** جدا می شود (۶۸). تعیین توالی نوکلئوتیدی (نوکلئوتید از انتهای **3'** ناحیه **1D** ژنوم **FMDV**) سه ویروس تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی که تیپ **O** بودند با اسیدهای نوکلئیک ناحیه مشابه ژنوم ویروس های تب برفکی تیپ **O** جدا شده از استان خراسان رضوی، ایران و کشورهای همسایه، نشان داد که دو ویروس جدا شده از استان (گاو- شهرستان چناران-مزرعه آستان قدس رضوی **O-As2-Ir-KR** و **O-As1-Ir-KR**) بیش از ۹۹٪ مشابهت دارند اما هر کدام از این ویروس ها با ویروس تعیین توالی شده از شهر نیشابور (**O-Ni-Ir-KR**) بیش از ۱۲ درصد فاصله (عدم مشابهت) نشان دادند. ویروس تعیین توالی شده از نیشابور تشابه بیشتری با ویروس ثبت شده در بانک ژن **MN539142.1-O/IRN/93/2016**، که ثبت کننده از آن بعنوان ویروس بکار رفته در واکسن یاد می کند (دکتر اکبر خراسانی-منتشر نشده)، را نشان می دهد.

و نیز تشابه اسید نوکلئیک آنها (در ناحیه سکانس شده) با برخی از ویروس های استان (ویروس های در گردش در استان خراسان رضوی) تشابه نشان می دهد. ویروس **O-As2-Ir-KR** و **O-As1-Ir-KR** بیشترین تشابه را با ویروس های استان (تعیین توالی شده اما ثبت نشده در بانک ژن **A11-N-F3-KHR-01-O** و **B11-N-F4-KHR-O_02** و **C11-N-F5KHR-O**) نشان **2_03** و ویروس ثبت شده **JN652665.1-O/IRN/1/2010-KhR-Zibaee-Ahm**) نشان دادند همچنین با توالی های ثبت شده از ایران (**O - Ir_07** - **DQ767863.1** و **O - Ir_08** - **DQ767864.1**) قرابت بیشتری نشان دادند. و نیز با ویروس های تب برفکی تیپ

O تعیین توالی شده و ثبت شده در بانک ژنی ویروس‌های منطقه کشورهای ترکیه، عراق، پاکستان، افغانستان، ترکمنستان و نیز ایران بصورت درصدی از تشابه را نشان می‌دهند. ویروس تعیین توالی شده از شهر نیشابور (**O-Ni-Ir-KR**) بیشترین تشابه با ویروس **O** پاکستان (**MH784405.1-2017** با ۹۲/۳۴ درصد شباهت) نشان داده همچنین با ویروس **O** افغانستان (**KJ606977.1-2011**) با ۹۲/۱۳ درصد شباهت) و ویروس **O** ایران (**KR149715-1-2010** و **KJ831690.1-2010** و **KJ831691.1-2010**) با ۹۱/۲۴ درصد شباهت نشان می‌دهد.

همچنین مقایسه ویروس‌های جدا شده با **O** واکسن ایران که توسط آقای دکتر اسماعیل زاده و همکاران در بانک ژن به ثبت رسیده است. اختلاف بین ویروس‌ها را نشان می‌دهد. این اختلاف بخصوص در مقایسه دو ویروس جدا شده از چناران و نیشابور بیشتر است و ویروس تعیین توالی شده از نیشابور بیشتر به ویروس واکسن نزدیک تر است.

ویروس تب برفکی تیپ **O** بطور کلاسیک در ۱۰ تا ۱۱ قسمت تیپ آنتی ژنیک تقسیم‌بندی می‌شود (۴۱). این ویروس در آفریقای شمالی و خاورمیانه آندمیک می‌باشد.

همچنین به عنوان عامل بروز خسارات اقتصادی شدید همه گیری سال ۲۰۰۱ انگلستان شناسایی گردیده است. مقایسه ۱۷۰ نوکلئوتید (در انتهای **3'** ناحیه **D**) ژنوم ویروس تب برفکی تیپ **O** ویروس‌هایی که در سال ۱۹۹۱ در اپیدمی جنوب غربی بلغارستان رخ داد، با سویه واکسن نشان داد که این ویروس‌ها مشابه ویروسی است که برای ساخت واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ویروس‌ها وابسته به گروهی از ویروس‌ها هستند که در خاورمیانه از سال ۱۹۸۷ پیدا شده‌اند (۴۳). سکانس ۱۶۵ نوکلئوتید (ناحیه انتهای **3'** ژن **D**) ۲۵ ویروس **O** جدا شده در فاصله سالهای ۱۹۸۷ تا ۱۹۹۵ در هند و مقایسه آنها با سویه واکسن (**R2/75**) اختلافی بین ۷ تا ۱۵/۲ درصد را نشان داد (۵۰).

با مقایسه ویروس‌های تیپ **O** سکانس شده و ویروس ۲۰۰۱ انگلستان و با توجه به جایگزینی تیپ **O** سویه **Pan-Asia** در خاورمیانه می‌توان حدس زد که این ویروس‌ها از سویه پان آسیا و عضوی از توپوتیپ خاورمیانه-جنوب شرقی آسیا باشند. هم اکنون مشخص شده است که دگرگونی آنتی‌ژنیک در سروتیپ **O** از آنچه تصور می‌شده وسیع‌تر نیست و چند سویه واکسن بطور نسبی قادر به محافظت علیه بیشتر همه گیری‌ها می‌باشند. هرچند اختلاف ژنتیکی آنقدر زیاد باشد که اجازه دسته بندی در چندین دودمان جداگانه را بدهد (۴۳).

بنا به آنچه گفته شده و از آنجائیکه بیشترین درصد ویروس جدا شده از نمونه‌های مشکوک در استان ویروس **O** می‌باشد (۸۲ نمونه از ۱۰۳ نمونه مثبت، ۷۹/۶۱ درصد) نیاز به تحقیقات بیشتر در مورد قدرت پوشش واکسن برای منطقه وجود دارد. هر چند که بنظر می‌رسد واکسن تولیدی در ایران می‌تواند سطح محافظتی خوبی از آنتی بادی در دام ایجاد نماید.

ویروس تب برفکی تیپ **A** از نظر آنتی ژنیک متغیرترین سروتیپ محسوب می‌شود (۵۱).

ژنوم ویروس‌های **A** تعیین توالی شده از استان خراسان رضوی و **A-As-IR-KR-2019** (**Ni-As-IR-KR-2019**) پس از تعیین توالی نوکلئوتید با استفاده از عملیات بلاست (پایگاه **NCBI**) و نیز نرم افزار **BioEdit** و **MEGA** با ناحیه مشابه تعدادی از ویروس‌های **A** جدا شده در ایران، ترکیه، عراق و افغانستان و ترکمنستان مقایسه گردید. این مقایسه نشان می‌دهد که اسیدهای نوکلئیک بین ویروس استان **A- Ni-IR-KR-2019** و **A-AS- IR-KH-2019** اختلافی ندارند اما با ویروس‌های بکار رفته در واکسن حدوداً ۱۲ درصد اختلاف نشان می‌دهند. ویروس‌های دارای **RNA** بدلیل اینکه قدرت بهره‌جویی از مکانیسم اصلاح اشتباه در حین نسخه برداری و تکثیر ژنومی را ندارند. میزان موتاسیون در آنها زیاد است. حدوداً ۳-۱۰ تا ۵-۱۰ موتاسیون برای هر نوکلئوتید جهت یک بار تکثیر. بنابراین میزان تغییرات اسید نوکلئیک در

FMDV یک درصد در سال برآورد شده است، این میزان تغییرات بسیار زیادتر از آنها است که در عمل در جامعه دامی در ویروس در حال گردش اتفاق می افتد. و این شاید بدلائل ذیل باشد.

۱- برآورد زیاد میزان موتاسیون

۲- بسیاری از موتاسیون های اتفاق افتاده در جایگاه تأثیرگذار آنتی ژنیک زیستند و بعضی از موتاسیونها بی اثر می باشند.

۳- تنها تعداد کمی از ویروس هایی که موتاسیون یافته اند قادرند زنده مانده و فرصت عفونی کردن داشته باشند.

۴- آنتی بادی محافظتی که در جمعیت وجود دارد (واکسن یا محافظت طبیعی) قدرت محافظت در برابر تیپ جدید را دارد.

۵- تنها تعداد کمی از حیوانات آلوده (با تحت تیپ جدید) فرصت شرکت در چرخه انتقال می یابند (۲۱،۲۲،۳۲).

در این بررسی نواحی اسیدهای آمینه منطقه **VP1** ویروس جدا شده که دچار بیشترین تغییرات در مقایسه با سایر ویروس ها شده است 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 (۳۲،۶۰).

Kithing و همکاران بیان می دارند که ایران و عراق در خاورمیانه بیشترین شیوع **FMD** را دارند و این شیوع در ایران بخاطر واریانت هایی از ویروس **A** اتفاق می افتد که توسط سویه واکسن قابل کنترل نیست و منبع آن نامعلوم است (۴۸). اما بنظر نمی رسد 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 **A/IV05** مصداق دارد (۱۶).

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/Iraq/64**) **A22** فرق داشتند. سکانس مستقیم ناحیه **VP1** این ویروس 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** متفاوت می باشند(۵۸).

تاکنون بیش از ۳۰ تحت تیپ جدید از ویروس **A** تب برفکی در نقاط مختلف جهان و از مناطق آندمیک بیماری تب برفکی شناسایی و ثبت گردیده است. در کشور ما تغییرات آنتی ژنیک و پیدایش تحت تیپ‌های جدید ویروس **A** در سالهای اخیر نسبت به سالهای گذشته شدت بیشتری پیدا نموده است بطوریکه در یک ده گذشته حداقل سه 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 قسمت تیپ بوده است) جدید به ثبت رسیده است. اینکه چرا در سالهای گذشته مواجه با تغییرات مکرر تیپ **A** تب برفکی هستیم خود نیاز به تحقیقات دارد ولی بطور کلی رژیم نامناسب واکسیناسیون، وجود دامهای حساس و غیرواکسینه می‌تواند علاوه بر خصوصیات ژنتیکی و تغییرپذیری خاص تیپ **A** تب برفکی، بعنوان فاکتور مورد توجه قرار گیرد (۹). در خصوص بررسی قرابت آنتی ژنیسته ویروس‌های جدا شده از استان خراسان رضوی در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ با ویروس‌های بکار رفته در واکسن تعیین ضریب شباهت آنتی ژنتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن (**r-value**) بر روی سه ویروس تیپ **O** انجام گرفت. نظر به اهمیت و میزان گسترش بیماری در گوسفند و میزان ماندگاری تیپ **O** در گوسفند و احتمال انتقال به گاو و اینکه در یک سال تنها در ۸ مورد تیپ **A** و دو مورد تیپ **Asia1** تایید شده است همچنین با توجه به اینکه جدا سازی ویروس در کشت سلولی بین ۲۰ تا ۳۰ درصد اتفاق می افتد و این موضوع که برای محاسبه (**r-value**) نیاز به آزمایش دو بعدی خنثی سازی ویروس می باشد که در آن نیز باید طی چند پاساژ ویروس در کشت سلولی رشد نماید با توجه

به فاکتور های یاد شده بنظر می رسد بررسی سه مورد قرابت آنتی ژنیتیکی ویروس کاری پر فعالیت می باشد. نتایج نشان می دهد که در هر سه مورد محاسبه، ضریب شباهت آنتی ژنیتیکی ویروس در گردش با ویروس واکسن **Relationship value (r-value)** بزرگتر از $0/3$ می باشد (۲۳). این امر حاکی از آن است که واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدرت تولید آنتی بادی محافظتی و ایجاد ایمنی لازم در برابر بیماری تب برفکی را داشته است. و تا زمانی که میزان اختلاف آنتی ژنیسیته ویروس های در گردش در استان خراسان رضوی با ویروس رفرنس در اثر موتاسیون های ویروسی و یا انتقال ویروس از کشور ها و یا استانهای همسایه بیشتر از $0/3$ نشده باشد تزریق واکسن یاد شده برای کنترل بیماری تب برفکی مناسب خواهد بود و این در حالی است که طبق گزارش اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی عملا دامدارهای عزیز علاوه بر واکسن پلی والان رازی از واکسن های ساخت کشور های خارجی (واکسن تب های برفکی " رکشا واک هند - آفتو واک ترکیه- مریال، وتاک) استفاده می کنند. این امر احتمال پیشبینی کنترل بیماری در طولانی مدت را با خطر مواجه خواهد نمود. لازم به ذکر است که دربرخی موارد در کانونهای اعلام شده نه تنها سابقه تزریق واکسن وجود داشته، فاصله لازم برای کسب ایمنی مورد انتظار نیز طی شده است، با این وجود یک گله در گیر شده است لذا علاوه بر تزریق واکسن برای کنترل بیماری توجه به موضوعات پر اهمیتی همچون لزوم رعایت موارد بهداشتی همچون ایمنی زیستی (بیوسکوریتی) (موضوعی که برای گله های دام سبک تاحد زیادی دشوار است)، خودداری از خرید و و فروش دام در دوره همه گیری بیماری و توجه کافی به نظارت بر اولین علامت بیماری در گله بسیار ضروری می باشد.

پیشنهاد می گردد با برگزاری جلسات ترویجی مناسب به دامداران عزیز توصیه گردد تا بدلائل زیاد از واکسن ساخت کشور استفاده نمایند و هر دو تا سه سال قرابت آنتی ژنیسیته ویروس های در گردش در استان خراسان رضوی با ویروس های واکسینال انجام پذیرد .

در مورد کانون‌های درگیر در استان خراسان رضوی چنین بنظر می رسد که طبق گزارش اداره کل دامپزشکی استان تعداد کانون‌های مشکوک (براساس علائم بالینی و ارسال نمونه) از تعداد متناسبی برخوردار می باشد و آنچه از بروز بیماری طی یکسال رخ داده طبق موارد قابل انتظار بوده است. و در بسیاری از مواقع بروز بیماری در گله هایی بوده که واکسن تزریق ننموده و یا زمان زیادی از تزریق واکسن می گذرد . این امر تایید کننده نتایج حاصل از طرح حاضر می باشد که بنا بر بررسی ژنتیکی و آنتی ژنتیکی واکسن مصرفی ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدرت محافظتی مناسبی را نشان داده است.

بررسی ها نشان می دهد که ویروس جدا شده در فصل بهار بیشتر تیپ **O** می باشد بنظر می رسد علت این امر این است که در اواسط فصل زمستان که بیشترین زایش گوسفندی انجام می گیرد، بره های این گوسفندان در بهار به سنی می رسند که بیشترین حساسیت را نسبت به تب برفکی دارند، چرا که در این زمان ایمنی مادری وجود نداشته و از طرف دیگر جمعیت بیشتر گله ها در حال تردد می باشند (چه به صورت عشایری و چه بصورت چرای آزاد) . از دیگر موارد دخیل در رخ داد بیماری می توان از افزایش خرید و فروش دام در بازار ها و میادین فروش (بخصوص در ماه خرداد) یاد نمود. **Perez** و همکاران ارتباط بین تراکم جمعیت دامی و بروز بیماری تب برفکی را معنی دار می دانند (۵۲). **Gilbetr** و همکاران بین حضور ویروس تب برفکی در گاو و تراکم جمعیت گوسفندی همبستگی مثبت پیدا نموده اند (۳۱). در تحقیق حاضر و در تحقیقی که در سال ۸۵ در استان انجام گرفته است بر اساس نتایج مربوط به ضریب همبستگی بین دو صفت بین حضور ویروس در گاو و تراکم جمعیت گوسفندی همبستگی مشاهده نشد. البته این نکته که گوسفند سبب تسهیل ماندگاری ویروس می گردد، مورد توافق می باشد. **Hughes** و همکاران (۲۰۰۲) رابطه مهمی بین ماندگاری تیپ **O** در گوسفند و گاو را گزارش می دهند. چنین بیان می گردد که گوسفند به تنهایی قادر به حفظ و ماندگاری ویروس نمی باشد ولی این

کار در جمعیت‌های مخلوط گوسفند و گاو بخوبی انجام‌پذیر است (Donaldson 2000، ۳۴). گله‌های گاو و گوسفند مخلوط زیادی در استان خراسان رضوی (بلکه در ایران) وجود دارد. در این مطالعه ۵۰ درصد نمونه‌هایی که در گاو آلوده تشخیص داده شده‌اند تیپ O و ویروس تب برفکی می‌باشد و این میزان در گوسفند ۷۲/۱ درصد نمونه‌های تأیید شده است. نتایج به دست آمده با نتایج Gilbert و همکاران (۳۱) و نیز نتایج بدست آمده در تحقیق زیبایی و همکاران در سال ۱۳۸۳ هم‌خوانی دارد (۷، ۲۱). این امر شاید به دلیل تمایل بیشتر ویروس تب برفکی تیپ O نسبت به سایر تیپ‌ها به گوسفند است. که می‌تواند یکی از دلایل مهم بقاء ویروس در جمعیت دامی (در استان و در ایران) باشد. نکته قابل ذکر این است که OIE تأکید بر انجام واکسیناسیون جمعیت گاوی دارد و معتقد است که با کنترل بیماری در گاو بیماری در جمعیت گوسفندی خودبخود کنترل می‌شود. (۵۱) اما علی‌رغم این توصیه باید توجه نمود که در کشور ما جمعیت نشخوارکنندگان کوچک حدوداً ده برابر جمعیت گاوی است، و به علت فرهنگ دامداری در منطقه و وجود دام‌های عشایری، می‌بایست برای جمعیت گوسفندی و واکسیناسیون آن اهمیتی ویژه قائل شد. باید توجه نمود که گوسفند و بز می‌توانند در اپیدمیولوژی تب برفکی نقش خطرناکی داشته باشند چرا که نشانی‌های بیماری در این حیوانات معمولاً فاقد علائم بالینی واضح بوده و یا دارای نشانی‌های بالینی بسیار خفیف می‌باشند (۲۶، ۳۴). اگرچه الویت برنامه‌ی کنترلی بر روی مایه‌کوبی سراسری در جمعیت گاو و گوساله متمرکز می‌باشد (۱۲)، با این حال به نظر می‌رسد بدلیل نقش گوسفند در اپیدمیولوژی بیماری (۴) اسکان عشایر و یا پوشش واکسیناسیون کامل جمعیت دامی آن‌ها بتواند کامی موثر در کنترل بیماری تب برفکی باشد.

منابع:

- ۱- بهاری، اصغر. (۱۳۸۳). بررسی فراوانی حامل‌های ویروس تب برفکی در گاوهای ذبحی کشتارگاه زیاران، دانشگاه تهران، پایان نامه تخصصی، شماره ۱۹۲ سال تحصیلی ۸۴-۱۳۸۳
- ۲- پرمور، عفت. (۱۳۷۷). بررسی ویروس تب برفکی بر روی دو سلول BA و هیبرید، پایان نامه دانشجویی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شماره ۱۵، سال ۷۸-۱۳۷۷
- ۳- مهروانی، ه.، عظیمی، س.م.، احمدی، ع.، جیرانی، ف. تشخیص سریع و دقیق ویروس تب برفکی با روش Real time PCR در نمونه های بالینی، آرشیو رازی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۲، ۱۰۷-۱۰۱
- ۴- دلیمی اصل، عبدالحسین. معتمدی، غلامرضا. مودنی جولا، غلامرضا. (۱۳۷۸). اپیدمیولوژی دامپزشکی کاربردی، توماس بلاها، انتشار آییز
- ۵- رشتی باف، محمد. (۱۳۸۱). روند پنج ساله (۷۵-۸۰) تب برفکی در استان خراسان، فصلنامه جامعه دامپزشکان خراسان، شماره ۱، پائیز، صفحات ۴۲-۴۷
- ۶- رفیعی کرکوندی، علیرضا. (۱۳۷۸). بیماری تب برفکی، سازمان دامپزشکی کل کشور، معاونت بهداشتی و پیشگیری، بهار ۱۳۷۸
- ۷- زیبایی، س. (۱۳۸۵). جداسازی و شناسایی سرلوزیکی ویروس تب برفکی از گاوهای استان خراسان رضوی، رساله دکتری دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران.
- ۸- زیبایی، س.، رضائی، ص.، رشتی باف، م. فراوانی حامل های ویروس تب برفکی در گوسفندان ذبحی کشتار گاه مشهد با استفاده از RT-PCR. مجله تحقیقات دامپزشکی، بهار ۱۳۹۴- دوره ۷۰، شماره ۱، ۷-۱۴

۹-زیبائی، س. کیوانفر، ه. ربانی، م. کیانی زاده، م. فتحی نجفی، م. فرهودی، م. همتی، م. مقایسه ناحیه **VP1** ژنوم ویروس تب برفکی تیپ **A** جدا شده از استان خراسان رضوی با ویروس های جدا شده از سایر استانها و همسایه. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۵، تابستان ۱۳۸۹، ۱۹۹-۲۰۲.

۱۰-زیبائی، س. کیوانفر، ه. ربانی، م. کیانی زاده، همت زاده، ف. بکائی، س. شناسائی کانون های آلوده به ویروس تب برفکی در استان خراسان رضوی با روش های الیزا و **RT-PCR**. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۳، ۱۵۱-۱۵۵

۱۱- طالب شوشتری، عبدالمحمد. (۱۳۸۲). مهروانی، همایون. صالحی زاده، مهدی. اهورائی، پرویز: مقایسه اثربخشی و طول دوره ایمنی واکسن تب برفکی ساخت شده با دو یاور آبی

(ژل دالومین + ساپونین) (مونتانايد)، فصل نامه پژوهش و سازندگی، شماره ۵۸، بهار ۱۳۸۲

۱۲- عبدالهی، داراب. (۱۳۸۴). برنامه مایع کوبی همزمان و سراسری تب برفکی در کشور- چهاردهمین گنگره دامپزشکی ایران، تهران، اسفند ۱۳۸۴

۱۳- قریشی، سیدعلی. دلیری، مرتضی. حاجیان، ترانه. بانوئی، محمد مهدی. الوندی، علیرضا.

(۱۳۸۰). تشخیص ویروس تب برفکی در نمونه های کلینیکی به روش **RT-PCR**، پژوهش

و سازندگی، شماره ۵۳، زمستان ۱۳۸۰

۱۴- کیانی، غلامعلی. (۱۳۸۴). مطالعه ماکرو اپیدمیولوژیکی اپیدمی ناشی از تحت تیپ جدید

ویروس **A** تب برفکی چهاردهمین گنگره دامپزشکی ایران، تهران، اسفند ۱۳۸۴

۱۵- کیوانفر، هادی. کریمی، ناصر. (۱۳۸۶). ویروس شناسی دامپزشکی. تالیف، اف، جی، فز،

بخش بیماریها، انتشارات دانشگاه تهران

۱۶- کیوانفر، هادی. کریمی، ناصر. (۱۳۸۶). ویروس شناسی دامپزشکی. تالیف، اف، جی، فخر،

بخش بیماریها، انتشارات دانشگاه تهران

۱۷- مسعودی، شهین. کلون نمودن و بیان آنتی ژن ایمنی زای اصلی (VP1) ویروس تب

برفکی در باکتری **E-coli** (۱۳۷۹). پایان نامه دوره تخصصی **PhD**. انستیتو پاستور ایران.

۱۸- مهربانی، همایون. ایزدی، حسن. صالح زاده، مهدی. خراسانی، اکبر. تقی زاده، مرتضی. قرشی،

سید علی. غفاری، جعفر. (۱۳۸۴). تهیه واکسن جدید تب برفکی با استفاده از سویه جدید

A05/IR، چهاردهمین گنجره دامپزشکی ایران، تهران، اسفند ۱۳۸۴

19-Ansell, D,M. Samuel, A,R. Carpenter,W,C and Knowles, N,J.(1994). Gentic relationships

between foot –and- mouth disease type Asia1. Epidemiology and Infection 112:213-224

20-Alexandersen, S., Zhang, Z.and Donaldson, A. I. and Garland A, J, M; The Pathogenesis and diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. J. Com.Path.2003, Vol.129,1-36

21-Al-shawkany, A-R. Nassiri, M. Zibaei, S Tahmoorespour, M. Ziaratnia, SM. Fathi

Najafi, M. Haghparast, A. Ghovvati1, Sh Pourseyed, S, H Rashtibaf, M. Amino acid diversity of antigenic sites of Iranian Type O foot-and-mouth disease Virus. Journal of Cell and Molecular Research (2011-2012) 3 (2), 66-74

22-Anisur Rahman, A, K, M . Shaheenur Islam, K. Abu Sufian, Md. Hasanuzzaman Talukder,

Md.P, Ward, W. Martínez-López, B Foot-and-Mouth Disease Space-Time Clusters and Risk

Factors in Cattle and Buffalo in Bangladesh. Pathogens 2020, 9, 423;

doi:10.3390/pathogens9060423

23-Asfor, A, S. Howe, N. Grazioli, S. Berryman, S. Parekh, K. Wilsden, G. Ludi, A. King, D, P.

Parida S., Brocchi, E. Tuthilla T, J. Detection of Bovine Antibodies against a Conserved Capsid

Epitope as the Basis of a Novel Universal Serological Test for Foot-and-Mouth Disease. Journal

of Clinical Microbiology. June 2020 Volume 58 Issue 6 e01527-19

- 24-Belsham, G, J.Macinerney,G,M.Ross-Smit,N.(2000).Foot-and-Mouth disease virus 3C protease induced cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells.J.Virol.74,272-280
- 25-Brown, F., and Mowat, N. 2003. Control of foot-and-mouth disease by vaccination. Vet. Rec. 152: 376.
- 26- Callens, M., De Clercq, K., Gruia, M. and Danes, M. (1998). Detection of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction and virus isolation in contact sheep without clinical signs of foot-and-mouth disease. Vet. Quart. 20 (Suppl. 2) S37- S40.
- 27- Donaldson, A.I. (2000). The role of sheep in the epidemiology of foot-and-mouth disease and proposals for control and eradication in animal populations with a high density of sheep. Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD, Borovets, Bulgaria, 5 to 8 September 2000
- 28-Dory, D., Rémond, M., Béven, V., Cariolet, R., Zientara, S., and Jestin, A. 2009 Foot-and-Mouth Disease Virus neutralizing antibodies production induced by pcDNA3 and Sindbis virus based plasmid encoding FMDV P1-2A3C3D in swine. Antiviral Research 83: 45-52.
- 29-Ferris ND.Dowson M. (1988). Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with foot-and-mouth and swine vesicular disease.Vet.Microbio.16,201-209
- 30-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(2),311-317
- 31-Gilbert, M. Aktas, S. Alisafar, M. Otarod, V. Sumptio, K. Tufan, M. Slingenbergh, J. (2004). FMD in Turkey and Iran-trends and relationships fao.org/ag/againfo/commissions/docs/greece04/App30.pdf

32- Haydon, D.T., Samuel, A.R. and Knowles, N.J. (2001). The generation and persistence foot-and-mouth disease virus. Prevent. Vet. Med. 51: 111-124

33- Hedger, R.S. (1968). The isolation and characterization of foot-and-mouth disease from clinically normal herds of cattle in Botswana. J. Hyg., Camb. 66: 27-36.

34-Hughes, G.J. Mioulet, 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 viraemia over time. J. Gen. Virol. 83: 1907-1914.

35-<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/Virus/Picornaviridae/Aphtovirus/fmd.htm>.

36- <http://www.oie.int/Foot and Mouth Disease.htm>

37-Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory (2003). Foot-and-mouth disease: scientific problems and recent progress. 1st annual report prepared for DEFRA, Science Directorate. Pp: 1-37.

38-Kipe, D, M. Howley, P, M. (2001). Fields Virology. Fourth edition. Lippincott Williams & wilkins. chapter 23. 685-722

39-Kitching.R.P. Hughest.G. J. (2002): Clinical variation in foot and mouth disease; sheep and goats.Rev.sci. tech. off int. Epiz,21(3); 505-512

40-Kitching, R,P; ARecent History of Foot-and-Mouth Disease .J.Comp Path.1998 Vol.113,89-108

41 Kitching, R. P. (2002). Clinical variation in foot and mouth disease: cattle. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 21(3): 499-504

42-.Kitching, R. P. and Hughes, G. J. (2002). Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz., 21(3): 505-512

43-Knowles, N. J. and Samuel, A. R. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. Virus Res. 91: 65-80

44-Kompasli, T. Van Ha, P. Nguyen, H-T-M. Garner, G. Roche, S. East, I. Optimal surveillance against foot-and-mouth disease: A sample average approximation approach. PLOS ONE.

July 9. 2020..<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235969>

45-Locher, F., Suryanaray, V.V.S. and Tratschin, J. D. (1995). Rapid detection and characterization of foot-and-mouth disease virus by Restriction enzyme and Nucleotide sequence analysis of PCR products. J. Clin. Microbiol. 33 (2): 440-444.

46-Lubroth, J. (2002). Foot-and-Mouth disease A review for the practitioner , Vet clin Food Animal 18. 475-499

47- Mann, J, A and Sellers: Virus infection of ruminant –chapter 46-Foot-and-Mouth Disease Virus.503-511

48- Mason, P. W., Grubman, M. J. and Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. Virus Res. 91: 9-32

49- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J.(1999).Veterinary Virology, 3rd edition. Academic Press. Pp: 521-528.

50- Office International Des Epizooties.(2000). Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, lists A and B disease of mammals, birds and bees. 4th ed. OIE, Paris, Pp: 77-92.

51-Office International Des Epizooties (2002): foot and mouth disease: Facing the new dilemmas; volume 21(3) December 2002

52-Perez, A, M.Thurmond,P,W and Carpenter, T,C; Use of the scan statistic on disaggregated province-based data: Foot-and-mouth disease in Iran. Preventive Veterinary Medicine

53-Piccone, M. E., Segundo, F. D.-S., Kramer, E., Rodriguez, L. L., and de los Santos, T. 2011. Introduction of tag epitopes in the inter-AUG region of foot and mouth disease virus: Effect on the L protein. Virus Research 155: 91-97

54- Reid, S.M., Ferris, N.P., Hutching, G.H., De Clerq, K., Newman, B.J., Knowles, N.J. and 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.

55- Reid, S.M., Ferris, N.P., Hutchings, G.H., Samuel, A.R. and Knowles, N.J. (2000). Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. J. Virol. Method. 89: 167-176

56- Sáiz, M., Núñez, J. I., Jimenez-Clavero, M. A., Baranowski, E. and Sobrino, F. (2002). Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. Microb. Infect. 4: 1183-1192

57- Sakamoto, K., Kanno, T., Yamakawa, M., Yoshida, K., Yamazoe, R. and Murakami, Y. (2002). Isolation of foot-and-mouth disease virus from Japanese Black cattle in Miyazaki prefecture, Japan, 2001. J. Vet. Med. Sci. 64: 91-94

58- Samuel, A.R. Knowles, N. J and Kiching, R, P (1988) serological and biochemical analysis of some recent type A foot –and –mouth disease virus from the Middel East. Epidemiology and Infection 101:577-590

59- Sanz-Parra, A., Sobrino, F. and Ley, V. (1998). Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. J.

General Virol. 79: 433-436 60-Semler, B, L and Wimmer, E; Molecular Biology of Picornaviruses .ASM Press.2002.

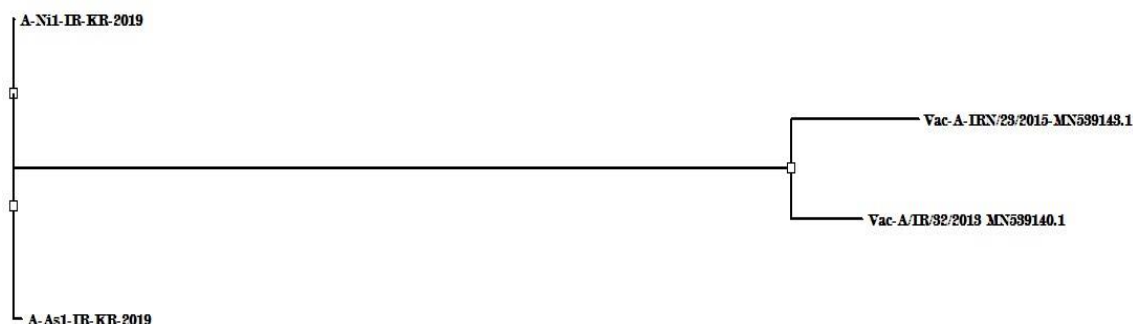
60-P., Barteling, S.S., Olascoaga, R.S. and Sumption, K.J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. Virus Res. 91: 101-144

61-Zhang. Z. and Alexandersen, S. (2003). Detection of carrier cattle and sheep persistently infected with foot-and-mouth disease virus by a rapid real-time RT- PCR assay. J Virol. Method. 111: 95-100

62- Zhang, Z. W., Zhang, Y. G., Wang, Y. L., Pan, L., Fang, Y. Z., Jiang, S. T., Lu, J. L., and Zhou, P. 2010. Screening and identification of B cell epitopes of structural proteins of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1. *Vet Microbiol* 140: 25-33

63-Zhang, K., Huang, J., Wang, Q., He, Y., Xu, Z., Xiang, M., Wu, B., and Chen, H. 2011a. Recombinant pseudorabies virus expressing P12A and 3C of FMDV can partially protect piglets against FMDV challenge. *Research in Veterinary Science* 91: 90-94.

۷- ضامم



0.1

A-As1-IR-K	0.0000	0.0193	1.6502	1.5484
A-Ni1-IR-K	0.0193	0.0000	1.6378	1.5356
Vac-A-IRN/	1.6502	1.6378	0.0000	0.3565
Vac-A/IR/3	1.5484	1.5356	0.3565	0.0000

۷-۱- رسم دندوگرام فیلوژنتیک و قرابت ویروس‌های تب برفکی تیپ **A** جداشده از خراسان رضوی در سال ۱۳۹۸ و مقایسه آنها با ویروس‌های تیپ **A** واکسن تب برفکی ساخت موسسه تحقیقات موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی (نرم افزار **BioEdit**)

۷-۲- نتایج میزان تشابه اسیدهای نوکلئیک ویروس **O** جدا شده از استان خراسان رضوی در سال ۲۰۲۰ میلادی همراه با ویروس های **O** تعیین توالی شده کشور های همسایه ده ویروس **O** که در بررسی حاصل از **BLAST** در **NCBI** از نظر اسید های نوکلئیک قرابت نزدیکی با ویروس تعیین توالی شده در استان خراسان رضوی نشان داده اند) ثبت شده در بانک ژن (آنهایی که در **NCBI** ثبت شده اند با نرم افزار **MEGA**).

Alignment: D:\FMD_94-1\seq\ARSAL-FINAL\O\O-As1+As2+Ni+old KR -ok .docx

	10	20	30	40	50
O-As1-IR-K	AAGCAATGGA	GCAAGTCGAG	TTCAGGAGTT	GTCT--TGCA	G--GTGC---
O-As2-IR-K	ACGCAGTG-A	GCAGGTCGAG	TTCAGGAGTT	GTCT--TGCA	G--GTGC---
O-Ni-IR-KR	-----	-----	-----	-----	-----
MN539142.1	-----	-----	-----	-----	-----
HQ663879.1	AAAAGACCAA	ATTAATGTAT	TGGACCTGA-	--TGCAAACC	CCCGCCCACG
JN652665.1	GAGGAACTCC	GACCCCTGAT	CCAACAGACC	TCGTTTGTGA	AACGCGCTTT
HQ450646.1	GGACAGGGTT	CTCGCTCAGT	TTGACTTGT-	--CTTTGGCA	GCGAAGCACAC
HQ450645.1	AAAAGACCAA	ATTAATGTAT	TGGACCTGA-	--TGCAAACC	CCCGCCCACG
JF916987.1	AAAAGACCAA	ATTAATGTAT	TGGACCTGA-	--TGCAAACC	CCCGCCCACA
JF916986.1	AAAAGACCAA	ATTAATGTAT	TGGACCTGA-	--TGCAAACC	CCCGCCCACG
JF916985.1	AAAAGACCAA	ATTAATGTAT	TGGACCTGA-	--TGCAAACC	CCCGCCCACA
HQ663880.1	CCTACCTCGT	GCCTCGTCAT	CTTTTCGCAG	AGAAGTATGA	CAAGATCATG
A11_KHR3	-----	-----	-----	-----	-----T
A11_KHR3	-----	-----	-----	-----	-----T
A11_N-F3-K	-----	-----	-----AAGCT	G-TT-TCACA	G--GTGC---
B10_N-G-Gp	TGCWGATTGC	TTTTGRTGTA	CWGAWCTGAM	TCAAGTMACA	RMAATTTTATG
B11_KHR4-0	-----	-----	-----	-----	-----
B11_N-F4--	-----	-----	-----AAAGCT	G-TT-TCACA	G--GTGC---
C11_N-F5KH	-----	-----	-----AAGCT	G-TT-TCACA	G--GTGC---
E09_NAZEM-	-----	-----	-----AGGAGTT	GCTT--TGCA	G--GTGC---
G06_p6-NP	-----	-----	-----	-----	-----

	60	70	80	90	100
O-As1-IR-K	--CA--CTAT	CTTTTG----	-----C	TTGTGTCTTG	C-----
O-As2-IR-K	--CA--CTAT	CTTTTG----	-----C	TTGTGTCTTG	C-----
O-Ni-IR-KR	-----	-----	-----	--AGGGCCCCG	CTCAGTACTA
MN539142.1	-----	-----	-----	-----	-----
HQ663879.1	CTTT--GGTA	GGTGCAC----	-----TC	CTCCGCACCG	CCACCTACTA
JN652665.1	CAAGCGCCTG	AAGGAAA----	-----AC	TTTGAGATCG	TTG-----CC
HQ450646.1	TGTC--AAAC	ACCTTTC----	-----TT	GCAGGTCTCG	CCCAGTACTA
HQ450645.1	CTTT--GGTA	GGTGCAC----	-----TC	CTCCGCACCG	CCACCTACTA
JF916987.1	CTTT--GGTA	GGTGCAC----	-----TC	CTCCGCACTG	CCACCTACTA
JF916986.1	CTTT--GGTA	GGTGCAC----	-----TC	CTCCGCACCG	CCACCTACTA
JF916985.1	CTTT--GGTA	GGTGCAC----	-----TC	CTCCGCACCG	CCACCTACTA
HQ663880.1	TTGGACGGCA	GAGCCA----	-----TG	ACAGACAGTG	ACTACAGAGT
A11_KHR3	TTGAGTTTTT	TGGCT-----	-----	CTGGGGATAG	TAT-----
A11_KHR3	TTGAGTTTTT	TGGCT-----	-----	CTGGGGATAG	TAT-----
A11_N-F3-K	--CA--CTAT	CTTTTG----	-----T	TTGCGTCTTG	C-----
B10_N-G-Gp	TCTWAATACT	CCGCAAGCCT	TTCTTGCATC	CTTAWGATAA	TTTGATTTAT
B11_KHR4-0	-----	-----CT-----	-----	CTGGGGATAG	TAT-----
B11_N-F4--	--CA--CTAT	CTTTTG----	-----T	TTGCGTCTTG	C-----
C11_N-F5KH	--CA--CTAT	CTTTTG----	-----T	TTGCGTCTTG	C-----
E09_NAZEM-	--AA--TGAT	CTGCTG----	-----C	TTGTGTCTGT	CC-----
G06_p6-NP	-----NNNN	NNNNNNN----	-----NN	NNNNANANTG	N-----

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110      120      130      140      150
O-As1-IR-K ----TTCGTT CGGG----- -TGGATGGCC AGAAGAGGC- -----CG
O-As2-IR-K ----TTCGTT CGGG----- -TGGATGGCC AGAAGAGGC- -----CG
O-Ni-IR-KR  ----CGCGCA -GTA-----C AGTGGCA--C CATCA--ACC -----TG
MN539142.1 -----AGTGGCA--C CATTAA--ACC -----TG
HQ663879.1 C---TTCGCA GATT-----T AGAGGTGG-T AGTGAA-ACA CG-----AG
JN652665.1 ---CTGTGTT TGA CTC--T ACTGGCAA-A CATAGTGATC ATGATCCGCG
HQ450646.1 ----CACACA -GTA-----C AGTGGCA--C TATTA--ACC -----TG
HQ450645.1 C---TTCGCA GATT-----T AGAGGTGG-T AGTGAA-ACA CG-----AG
JF916987.1 C---TTCGCA GATT-----T AGAGGTGG-C AGTGAA-ACA CG-----AG
JF916986.1 C---TTCGCA GATT-----T AGAGGTGG-C AGTGAA-ACA CG-----AG
JF916985.1 C---TTCGCA GATT-----T AGAGGTGG-C AGTAAA-ACA CG-----AG
HQ663880.1 GT-TTGAGTT TGAG----AT TAAAGTA--- AAAGG--ACA GGACATGCTC

```

```

A11_-KHR3_ ---GATCGCA AGAT-----T GAAAATTA-- --AAGAAMY- -----TG
A11_-KHR3_ ---GATCGCA AGAT-----T GAAAATTA-- --AAGAAMY- -----TG
A11_N-F3-K ---CTCATC CGGA----- -TGAATGGCC AAAARAGGC- -----CG
B10_N-G-Gp GATTCTCGTT TTCTAGCTCC ATGWACTATT GRAGWCAGKG MGACATGAGG
B11_KHR4-0 ---GATCGCA AGAT-----T GAAAATTA-- --AAGAAAT- -----TG
B11_N-F4-- ---CTCATC CGGA----- -TGAATGGCC AAAAGAGGC- -----CG
C11_N-F5KH ---CTCAYC CGGR----- -TGAATGGCC AAAARAGGC- -----CG
E09_NAZEM- ---TGCGAC RACACT---- -TCCACTGCC AGCAGWGGC- -----CG
G06_-p6-NP ---CTCGGC TGANCT--T- -TGAGCCTCA CGAGGGTTTT GACCAGACTC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160      170      180      190      200
O-As1-IR-K GGGGCAGT-- -----ATGT TT----- -----CAGCCCT
O-As2-IR-K GGGGCAGT-- -----ATGT TT----- -----CAGCCCT
O-Ni-IR-KR C-----A-- -----CT----- -----TCATGT-
MN539142.1 C-----A-- -----CT----- -----TCATGT-
HQ663879.1 GGGA---ACC T-----TAC CT-----GGG TCCCGAA--- ---TGGGGCG
JN652665.1 AGACTCGCAA GAGACAGCAG ATGGTGGATG ACGCAGTGA- ---ATGAGTA
HQ450646.1 C-----A-- -----CT----- -----TCATGT-
HQ450645.1 GGGA---ACC T-----TAC CT-----GGG TCCCGAA--- ---TGGGGCG
JF916987.1 GGGA---ACC T-----TAC CT-----GGG TCCCGAA--- ---TGGGGCG
JF916986.1 GGGA---ACC T-----TAC CT-----GGG TCCCGAA--- ---TGGGGCG
JF916985.1 GGGA---ACC T-----TAC CT-----GGG TCCCGAA--- ---TGGGGCG
HQ663880.1 TCAGACGCCG -----CG CTCATGGTGC TCCACCGTGG GAATCGCGTG
A11_-KHR3_ ACGGAAGA-- -----ATAC -----CACA- ---AGGAGTG
A11_-KHR3_ ACGGAAGA-- -----ATAC -----CACA- ---AGGAGTG
A11_N-F3-K GGGGCAGT-- -----ATGT TT----- -----CAGCCCT
B10_N-G-Gp AKGTCCKCTT AAAGATACAA CTGAGYAYAT GRATACGAAG ---ATGMTAG
B11_KHR4-0 ACGGAAGA-- -----ATAC -----CACA- ---AGGAGTG
B11_N-F4-- GGGGCAGT-- -----ATGT TT----- -----CAGCCCT
C11_N-F5KH GGGGCAGT-- -----ATGT TT----- -----CAGCCCT
E09_NAZEM- GGGGCAGT-- -----AGAG CY----- -----CGGCACG
G06_-p6-NP TCNNNNNN-- -----AN NT----- -----CA- ---TCCTCTG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210      220      230      240      250
O-As1-IR-K CTTTCATACGG ----TAAAGC ----AGT--- TCGGTCACCC -----GA
O-As2-IR-K CTTTCATACGG ----TAAAGC ----AGT--- TCGGTCACCC -----GA
O-Ni-IR-KR -----T CACCGGGC-- --CCACTGAC GCGAA-----A
MN539142.1 -----T CACTGGAC-- --CCACTGAC GCGAA-----A
HQ663879.1 CCCGAGACAG CGTTGGATAA CACCACCAAT CCAACGGCTT ACCAC----A
JN652665.1 CATTGAAAAG GCAAACATCA CCACAGATGA CAAGACTCT- TGACGAGGCG
HQ450646.1 -----T CACAGGGC-- --CCACTGAC GCGAA-----A
HQ450645.1 CCCGAGACAG CGTTGGATAA CACCACCAAT CCAACGGCTT ACCAC----A
JF916987.1 CCCGAGACAG CGTTGGATAA CACCACCAAT CCAACGGCTT ACCAC----A
JF916986.1 CCCGAGACAG CGTTGGATAA CACCACCAAT CCAACGGCTT ACCAC----A
JF916985.1 CCCGAGACAG CGTTGGATAA CACCACCAAT CCAACGGCTT ACCAC----A
HQ663880.1 ---CGGGACA TCACGAAACA C----TTCCG -TGATGTGGC AAGAATGAAG
A11_KHR3_ GATTGTGCGG --CTTAATT- ---TGAC--- TCAACGCG-- -----AG
A11_KHR3_ GATTGTGCGG --CTTAATT- ---TGAC--- TCAACGCG-- -----AG
A11_N-F3-K CTTTCATGCGG ----TAAAGC ----AAT--- TCAGTCACCT -----GG
B10_N-G-Gp GGTCATKGA TCAWTAAGAA CACTGTAATA GCAAACTTTG GGAATGCATT
B11_KHR4-0 GATTGTGCGG --CTTAATT- ---TGAC--- TCAACGCG-- -----AG
B11_N-F4-- CTTTCATGCGG ----TAAAGC ----AAT--- TCAGTCACCT -----GG
C11_N-F5KH CTTTCATGCGG ----TAAAGC ----AGT--- TCAGTCACCT -----GG
E09_NAZEM- TTTTCATGCGC ---ACGAGA- ---AGCTCG TGAATGGCC- -----
G06_p6-NP G--CATGATG TCCAGGAGC- ----AGTTGG CCGGGGGTCT C---TC---CT
    
```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      260      270      280      290      300
O-As1-IR-K GTA----GCT T--TGA---- -TGG-CAC-- ----CG-TA
O-As2-IR-K GTA----GCT T--TGA---- -TGG-CAC-- ----CG-TA
O-Ni-IR-KR GCGCGTTACA TGATTGCA-- -TACGCCC-- ---CCCCCGG ----CATGG
MN539142.1 GCGCGTTACA TGATTGCA-- -TATGCCC-- ---CACCTGG ----CATGG
    
```

```

HQ663879.1 AGGCACCGCT CACTCGTCTT GCACTGCCT- ---TACACGG ----CACCA
JN652665.1 GAAAAGAACC CTCTG---GA AACCAGTGGT GCCAGCAC-- ----TGTTG
HQ450646.1 GCGCGTTACA TGATTGCA-- -TATGCCC-- ---CCCCCGG ----CATGG
HQ450645.1 AGGCACCGCT CACTCGTCTT GCACTGCCT- ---TACACGG ----CACCA
JF916987.1 AGGCACCGCT CACTCGTCTT GCACTGCCT- ---TACACGG ----CACCA
JF916986.1 AGGCACCGCT CACTCGTCTT GCACTGCCT- ---TACACGG ----CACCA
JF916985.1 AGGCACCACT CACTCGTCTT GCACTGCCT- ---TACACGG ----CACCA
HQ663880.1 AAA-GGAACC CCCGTCGTTG GTGT----- -TATCAACAA CGC--CGATG
A11_KHR3_ GTA----ACT TACCAA---- -TATTTT ----TATTA
A11_KHR3_ GTA----ACT TACCAA---- -TATTTT ----TATTA
A11_N-F3-K GTA----KCT T--TGA---- -TAG-CTC-- ----CG-TA
B10_N-G-Gp ACAGWTAAAT CGTTTAAGAG TGAATTAAAT GWGACAGAGA GATTATGRRA
B11_KHR4-0 GTA----ACT TACCAA---- -TATTTT ----TATTA
B11_N-F4-- GTA----GCT T--TGA---- -TAG-CTC-- ----CG-TA
C11_N-F5KH GTA----KCT T--TGA---- -TAG-CTC-- ----CR-TA
E09_NAZEM- GTG----GCC C---GAA--- -TTG-CAC-- ----CA-AA
G06_p6-NP CTGG---GCC TTCCTGGGCG TG----- -TTTGCTTTC ----TGTC
    
```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360      370      380      390      400
O-As1-IR-K -----TCAACA--- CCTGCAGATC ACCCCTC--- ----ACATTG
O-As2-IR-K -----TCAACA--- CCTGCAGATC ACCCCTC--- ----ACATTG
O-Ni-IR-KR ----CATTCA CGCGGAGTGG GAC---ACTG GGTGAATT- ----CAAAA--
MN539142.1 ----CATTCA TGCGGAGTGG GAC---ACTG GGTGAATT- ----CAAAA--
HQ663879.1 GAGCCGCACA ACCAACGTGA GAGGTGACCT GCAAGTGTTG GCACAAAAGG
JN652665.1 GAATTCGAG CCCGCCGAAC CTGTGGAAGA ACAACCACA- -AGCTGAAGG
HQ450646.1 ----CATTCA TGCGGAGTGG GAT---ACTG GGTGAATT- ----CAAAA--
HQ450645.1 GAGCCGCACA ACCAACGTGA GAGGTGACCT GCAAGTGTTG GCACAAAAGG
JF916987.1 GAGCCGCACA ACCAACGTGA GAGGTGACCT GCAAGTGTTG GCCCAAAAAGG
JF916986.1 GAGCCGCACA ACCAACGTGA GAGGTGACCT GCAAGTGTTG GCCCAAAAAGG
JF916985.1 GAGCCGCACA ACCAACGTGA GAGGTGACCT GCAAGTGTTG GCCCAGAAGG
HQ663880.1 CATTGTAG-- --TGTGCATG GATGGAGACA CCATGCCTG- -GCCTCTTTG
A11_-KHR3_
A11_-KHR3_
A11_N-F3-K -----CCAACA--- CTTGCAGGTC ACCTCTC--- ----ACGTTG
B10_N-G-Gp TTGTGGAMGA WATGSCATCA TKTTTGAGGM TGSAGAATGG TAGTGYATAS
B11_KHR4-0 A-----
B11_N-F4-- -----CCAACA--- CTTGCAGGTC ACCTCTC--- ----ACGTTG
C11_N-F5KH -----CCAACA--- CTTGCAGGTC ACCTCTC--- ----AC---
E09_NAZEM- -----GCAAGGG-- ACCCCAGGTC GCCCCTT--- ----CTACCA
G06_-p6-NP -----TCTG GTCGCTGGTG CGGACGACTC TCCCCCT--- ---CCTGTTT
    
```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410      420      430      440      450
O-As1-IR-K GTTGCACGGC TCTC--ACTG TAC-----TT GCAATTC--- ---CCGTTG-
O-As2-IR-K GTTGCACGGC TCTC--ACTG TAC-----TT GCAATTC--- ---CCGTTG-
O-Ni-IR-KR -----T TTA--CATTC TCAATCCCTT AC-CTCTCG- --GCGG-TGA
MN539142.1 -----T TTA--CATTC TCAATCCCTT AC-CTTTCG- --GCAGCTGA
HQ663879.1 CGGCGAGGAC GCTGCCTACC TCCTTCAACT ACGGTGCCAT C-AAAGCTAC
JN652665.1 ACCCTACGCC GGGCC--ACT CGAGCGTCAG AAACCTCTGA AAGTGAGAGC
HQ450646.1 -----T TCA--CATTC TCAATCCCTT AC-CTCTCG- --GCGGCTGA
HQ450645.1 CGGCGAGGAC GCTGCCTACC TCCTTCAACT ACGGTGCCAT C-AAAGCTAC
JF916987.1 CGGCGAGGAC GCTGCCCACC TCCTTCAACT ACGGTGCCAT C-AAAGCTAC
JF916986.1 CGGCGAGGAC GCTGCCTACC TCCTTCAACT ACGGTGCCAT C-AAAGCTAC
JF916985.1 CGGCGAGGAC GCTGCCTACC TCCTTCAACT ACGGTGCCAT C-AAAGCTAC
HQ663880.1 CCTACAAGGC CGCCACCAAG GCCGGCTACT GTGGAGGAGC -CGTTCTCGC
A11_-KHR3_
A11_-KHR3_
A11_N-F3-K GTTGCGTGGT TCTC--RCCA TAC-----TT GCRGCTC--- ---CSGTTG-
B10_N-G-Gp AWWACCAAAC TGAATCKGAT YTCSAAATTY TAAMATTGAA WGWYGTACGR
B11_KHR4-0
B11_N-F4-- GTTGCGTGGT TCTC--GCCA TAC-----TT GCAGCTC--- ---CCGTTG-
C11_N-F5KH
E09_NAZEM- C---CATCAG TTGC--GGAG TAC-----CT GTTCACC--- ---CCGTTG-
G06_-p6-NP GGTGCTGGAG GAAGGAAACC TCGCCTGTG GAGGCCAGT ---CCCTCTA
    
```

	460	470	480	490	500
O-As1-IR-K	-TAAACGGTA	GCCAAA----	-ACACGGTGT	G-GTGCCGTG	TAGGGCAG-T
O-As2-IR-K	-TAAACGGTA	GCCAAA----	-ACACCCTGT	G-AAGA----	-----
O-Ni-IR-KR	-TA--CGCGT	ACACCGCG-T	CTGA-ACCGC	TGAGACTA--	CAAATG----
MN539142.1	TTA--CGCGT	ACACTGCG-T	CTGACACTGC	TGAGACCA--	CAAACG---T
HQ663879.1	CCG--GGTGA	GCGAGTTG-C	TTTACCGCAT	GAAGAGGGCT	GAAACA---T
JN652665.1	CAAGCT-ACC	ACAGCAAG-A	GGGACCCTAC	GCTGGCCCGA	TGGGGAGA-C
HQ450646.1	CTA--CGCGT	ACACCGCG-T	CTGATACCGC	TGAGACCA--	CAAATG---T
HQ450645.1	CCG--GGTGA	GCGAGTTG-C	TTTACCGCAT	GAAGAGGGCT	GAAACA---T
JF916987.1	CCG--GGTGA	ACGAGTTG-C	TTTACCGCAT	GAAGAGGGCT	GAAACA---T
JF916986.1	CCG--GGTGA	ACGAGTTG-C	TTTACCGCAT	GAAGAGGGCT	GAAACA---T
JF916985.1	CCA--GGTGA	ACGAGTTG-C	TTTACCGCAT	GAAGAGGGCT	GAAACA---T
HQ663880.1	AAAGGACGGA	GCC-GAGACT	TTCATCGTCG	GCACACACTC	TGCGGGCGGC
A11_-KHR3_	-----	-----	-----	-----	-----
A11_-KHR3_	-----	-----	-----	-----	-----
A11_N-F3-K	-TACGCGGTA	GCCAGG----	-ACACGGTGT	G-GTGCCGKG	TAAGGSAG-W
B10_N-G-Gp	YAAAAWC GGS	ATTTAGGATG	CMYMASATMK	ACTGACTTGA	GATARATATA
B11_KHR4-0	-----	-----	-----	-----	-----
B11_N-F4--	-TACGCGGWA	GCCAGG----	-ACACGGTGT	G-GTGCCGTG	TAAGGCAG-T
C11_N-F5KH	-----	-----	-----	-----	-----
E09_NAZEM-	-TACACTGTC	GCCAGC----	-ACTCGGTGT	G-GCGCGGKG	TAAGGGAG-T
G06_-p6-NP	GCG-GTTCTT	TCG--TCC-C	CAGTCTGTGA	GGNGATTTCN	NANAAAA---

	310	320	330	340	350
O-As1-IR-K	GTTGA-AGGA	AGTAGGCAAC	--GCCCT--C	GCTGCCT-TT	TG--GG----
O-As2-IR-K	GTTGA-AGGA	AGTAGGCAAC	--GCCCT--C	GCTGCCT-TT	TG--GG----
O-Ni-IR-KR	AGC---CGC-	CCAAGACACC	CGAG-----	GCGGCT---G	CCCACTG---
MN539142.1	AGC---CGC-	CTAAGACACC	CGAG-----	GCAGCC---G	CTCATTG---
HQ663879.1	CAC---CGTG	TCTTGGCTAC	CGTTTACAAC	GGGGACTGCA	AGTACGGCGA
JN652665.1	GTTTC-AGAG	AGAGAGCTCT	--CCCAGGAC	ACAAGGTGAG	TG-ATGACGT
HQ450646.1	AGC---CGC-	CCAAAACACC	TGAG-----	GCAGCC---G	CTCACTG---
HQ450645.1	CAC---CGTG	TCTTGGCTAC	CGTTTACAAC	GGGGACTGCA	AGTACGGCGA
JF916987.1	CAC---CGTG	TCTTGGCTAC	CGTTTATAAC	GGGGACTGCA	AGTACGGCGA
JF916986.1	CAC---CGTG	TCTTGGCTAC	CGTTTATAAC	GGGGACTGCA	AGTACGGCGA
JF916985.1	CAC---CGTG	TCTTGGCTAC	CGTTTATAAC	GGGGACTGCA	AGTACGGCGA
HQ663880.1	TC---GGGAG	AC-TGATTTT	---CTCTGGT	GAGGCCCTCA	CCTACAAGGA
A11_-KHR3_	TTTTG-AG-A	GAACGGTTTT	---TTGTT-T	GAGAATG-AC	CG--GGA---
A11_-KHR3_	TTTTG-AG-A	GAACGGTTTT	---TTGTT-T	GAGAATG-AC	CG--GGA---
A11_N-F3-K	GTTGA-AGGA	GGTAGGCAGC	--GTTCT--T	GCCGCCT-TC	TG--GG----
B10_N-G-Gp	GGCTCCAGAC	ATCGSRWTAG	TCCATGTAAT	AAGGATGTCT	GWCTACWTTT
B11_KHR4-0	TTTTG-AG-A	GAACGGTTTT	---TTGTT-T	GAGAATG-AC	CG--GGAAG-
B11_N-F4--	GTTGA-AGGA	GGTAGGCAGC	--GTTCT--T	GCCGCCT-TC	TG--GG----
C11_N-F5KH	GTTGA-AGGA	GGTAGGCAGT	--GTTCT--T	GCCGCCT-TC	TG--GG----
E09_NAZEM-	GTTGA-AGGA	ACTGGGTAGC	----TG---T	GCGGCGA-CC	CG--CGCC--
G06_-p6-NP	CTTTCTCCAG	ATCCGTT--T	GGGAT----C	GCGGCTTTGA	CC--CCTTC-

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....
      510      520      530      540
O-As1-IR-K GCAAGACGAG GGAGCGGTGC CTTGTGGTCA GCCGCTGGGT TGGCGCGGC
O-As2-IR-K -----
O-Ni-IR-KR TCCGGCATGG -ACGCGCCTC TCTCCACCCC C-----
MN539142.1 GCAGGGATGG -GTTTGCCCTG TTTCAAATCA CACACGGGAA GGCCGATGG
HQ663879.1 ACTGCCCCCG --GCCTCTTT TGGCCATTCA CCCGAATGAA GCAAGACAC
JN652665.1 AAAAGCCACT GAAAGTGAAA GCAAAAGCCC CGGTCGTAA GGAAGGGCC
HQ450646.1 ACAGGGATGG -GTTTGCCCTG TTTCAAATCA CACACGGGAA GGCCGATGG
HQ450645.1 ACTGCCCCCG --GCCTCTTT TGGCCATTCA CCCGAATGAA GCAAGACAC
JF916987.1 ACTGCCCCCG --GCCTCTTT TGGCCATTCA CCCGATGAA GCGAGACAC
JF916986.1 ACTGCCCCCG --GCCTCTTT TGGCCATTCA CCCAAATGAA GCGAGACAC
JF916985.1 ACTGCCCCCG --GCCTCTTT TGGCCATTCA CCCAAATGAA GCGAGACAC
HQ663880.1 AACGGAGTTG GATACTGCTC CTGCGTGTCC AGGTCCATGC TGCTCAAGA
A11_-KHR3_ -----

```

```

A11_-KHR3_ -----
A11_N-F3-K GCAAGTCGGG TGASCGGTGC CTT-----
B10_N-G-Gp AGCAGACTAG ACTGAAGATG CTTAATACGA TMGKCRGATA CGTATAGCA
B11_KHR4-0 -----
B11_N-F4-- GCAAGTCGGG TGAGCGGTGC CTTGTGGTAA GCCGTTGGAT TGGTGGTGT
C11_N-F5KH -----
E09_NAZEM- GCAAGTCTCG TAAACGGCTG CCTGTGGTAG GCGGTGGGGT TGCTTGGGT
G06_-p6-NP -----

```