تشخیص مولکولی و تجزیه تحلیل فیلوژنتیک شیوع ویروس بیماری لامپی اسکین درایران

غلامحسین کبیری چنار[۱]، غلامرضا محمدی [۲]*و مریم ترابی [۳] ، محمد رشتی باف [۳]

[۱]دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

[۲]گروه علوم درمانگاهی ، بهداشت و پیشگیری بیماری های دامی ، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] آزمایشگاه تشخیص اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی

* ایران - مشهد - میدان آزادی دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده دامپزشکی

کدپستی: ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴

صندوق پستی: ۱۷۹۳

پست الکترونیکی: gmohamad@um.ac.ir

چکیده

بیماری لامپی اسکین (LSD) یک بیماری ویروسی ویرانگر در گاو است که اخیراً از آفریقا به کشورهای خاورمیانه گسترش یافته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط بین ویروس‌های بیماری لامپی اسکین (LSDV) جدا شده از مناطق مختلف ایران و منشاء و انتشار این ویروس‌ها بوده است. در این مطالعه، از ۲۲۸ کانون رخداد مظنون به شیوع بیماری لامپی اسکین ۱۸٤ کانون در ۲۲ استان براساس نشانه های درمانگاهی مورد تایید قرار گرفته است. در ضمن نمونه ها جهت آزمایش به روش کمی پلی مراز Real Time PCR از ۹ استان کشور به تعداد ۳٤ نمونه دریافت و در آزمایشگاه تشخیص اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی مورد آزمایش قرار گرفت . از تعداد ۳٤ نمونه ، ۲٦ نمونه در ۷ استان در آزمایش کمی پلی مراز مثبت شدند. تعداد ۱۵ نمونه ویروس لامپی اسکین ، با تحت روش توالی یابی مستقیم Sanger-dideoxy قرار گرفتند. انجام جستجوی NCBI-Blast در توالی‌های بررسی‌شده نشان داد که همولوگ ترین توالی‌هایی که اکثر این توالی‌ها با آن‌ها همسو هستند، توالی‌های ویروس Lumpy Skin Disease Virus (GenBank MN642592.1) می باشند. درخت فیلوژنیکی رسم شده توالی های بدست آمده ، بیشترین شباهت را به جدایه‌های آفریقایی ، مانند کنیا (GenBank MN072619.1) و آسیایی مانند هند (GenBank MIN995838.1) داشتند. نتیجه گیری شد که شیوع بیماری لامپی اسکین احتمالاً در ایران با ورود ویروس های بیماری لامپی اسکین از کشورهای همسایه رخ داده است . اطلاعات توالی نوکلئوتیدی P32 به دست آمده منبع ارزشمندی در شناخت ماهیت ژنتیکی و اپیدمیولوژی مولکولی جدایه های ویروس بیماری لامپی اسکین محلی است.

کلمات کلیدی: بیماری لامپی اسکین . تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک. ژن P32، روش کمی پلیمراز Real Time PCR

۱. مقدمه:

بیماری لامپی‌اسکین[1] یا LSD یک بیماری ویروسی منتقل شونده توسط حشرات در گاو و گاومیش است که باعث ایجاد برآمدگی و ندول‌های پوستی در حیوان بیمار می‌شود. ویروس لامپی‌اسکین تنها یک سروتیپ به نام ویروس نیتلینگ دارد، که به عنوان سویه مرجع در تولید واکسن نیز بکار می‌رود. این بیماری تجارت و سلامت گاوها را بشدت تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین از لحاظ اقتصادی بیماری با اهمیتی محسوب می‌گردد. اولین گزارش این بیماری مربوط به کشور زامبیا در سال ۱۹۲۹ میلادی می‌باشد و پس از آن بیماری به سایر کشورهای آفریقایی، خاورمیانه، قفقاز، بالکان و غرب آسیا انتشار پیداکرده است. اولین مورد این بیماری در کشور ترکیه در سال ۲۰۱۳ گزارش‌گردید (۱-۳). لمپی‌اسکین در سال ۱۳۹۳ متعاقب شیوع آن در منطقه خاورمیانه و کشورهای عراق و ترکیه برای اولین بار از مرزهای غربی به کشور وارد شد. در خرداد ماه سال ۱۳۹۳ بیماری بصورت تأییدشده از استان کردستان در کشور گزارش‌گردید و با شیوع فراگیر بسیاری از دامداری‌های سایر استان‌های کشور نیز آلوده گردیدند. در ابتدا الگوی رخداد بیماری لامپی‌اسکین در کشور به صورت نوظهور اعلام شد، در حالی که هم‌اکنون بصورت بومی یا اندمیک شناخته می‌شود. بیماری لامپی‌اسکین در ایران جزو بیماری‌های اخطارکردنی محسوب می‌شود که باید به محض رخداد گزارش گردد و متعاقباً اقدامات بهداشتی مناسبی برای کنترل آن اتخاذ گردد. این بیماری جزو بیماری‌های فرامرزی یا مرزگذر یا (TADS)[2] طبقه بندی می‌شود. مهمترین اهرم مبارزه با بیماری لامپی‌اسکین در کشورهای اندمیک اجرای عملیات واکسیناسیون عمومی در دام‌های حساس در مقاطع زمانی مناسب می‌باشد. درک اپیدمیولوژی مولکولی برای بهبود راهبردهای ریشه کنی و کنترل بیماری لامپی اسکین (LSD)ضروری است. هدف از این مطالعه تشخیص مولکولی بیماری در نمونه های مشکوک به لامپی اسکین (LSD) گرفته شده از رخداد های طبیعی در جمعیت گاوهای ایران به روش Real time PCR ونیز بررسی خصوصیات مولکولی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ویروس (LSDV)[3] شناسایی شده است. به عبارت دیگر این مطالعه به منظور شناسایی مولکولی ویروس بیماری لامپی اسکین (LSDV) و تعیین میزان آن و ارتباط آن با سایر جدایه های ایرانی و همچنین ارزیابی منشاء انتشار این ویروس ها انجام شده است.

1 Lumpy skin disease
2 Transboundary Animal Diseases
3 Lumpy skin disease virus

۲- مواد و روش کار :

در این پژوهش رخداد بیماری لامپی اسکین در ایران در فاصله زمانی فروردین ماه لغایت اسفند ماه ۱۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفته است. نمونه‌گیری به روش غیراحتمالی و مبتنی برهدف انجام شده است، به محض مشاهده موارد مظنون ، پس از معاینه و شناسایی دام‌های مبتلا به بیماری از ضایعات جلدی آنها اقدام به تهیه نمونه و ارسال به آزمایشگاه تشخیص اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی شده است. همچنین برای هر کانون مشکوک به بیماری فرم بررسی میدانی کانون بیماری لامپی اسکین تکمیل می شد. استخراج ژنوم ویروس با استفاده از کیت مخصوص ، پس از آماده‌سازی نمونه ها مقداری از نمونه آماده شده جهت استخراج ژنوم ویروس با استفاده از کیت جدا سازی DNA (High pure PCR Template kit preparation ساخته شده در کمپانی Roche آلمان) انجام شده است. جهت تشخیص ویروس های بیماری لامپی اسکین براساس روش توصیه شده در سایت OIE و با توجه به مقاله آقای Bowden و همکاران (۹) انجام شده است .

جدول ۱: پرایمر و پروب های مورد استفاده

Lumpy skin disease virus	**Forward**	**CaPV074F1**	**AAAACGGTATATGGAATAGAGTTGGAA**
	Reverse	**CaPV074R1**	**AAATGAAACCAATGGATGGGATA**
	Probe	**CaPV074P1**	**FAM-TGGCTCATAGATTTCCT-MGB/NFQ**

جدول ۲: راهنمای مراحل Real Time-PCR

Real Time RT-PCR cycler conditions			
Step	**Time**	**Temperature**	**Cycle**
Pre-Incubation	**15 min**	**95°C**	**1**
Denaturation **Annealing**	**15 Sec** **45 Sec**	**95°C** **60°C**	**45**

۲-۱-تفسیر نتایج:

در هر تست می‌بایست دو کنترل مثبت و کنترل منفی به همراه کنترل منفی استخراج جهت اطمینان از صحت واکنش لحاظ گردد.

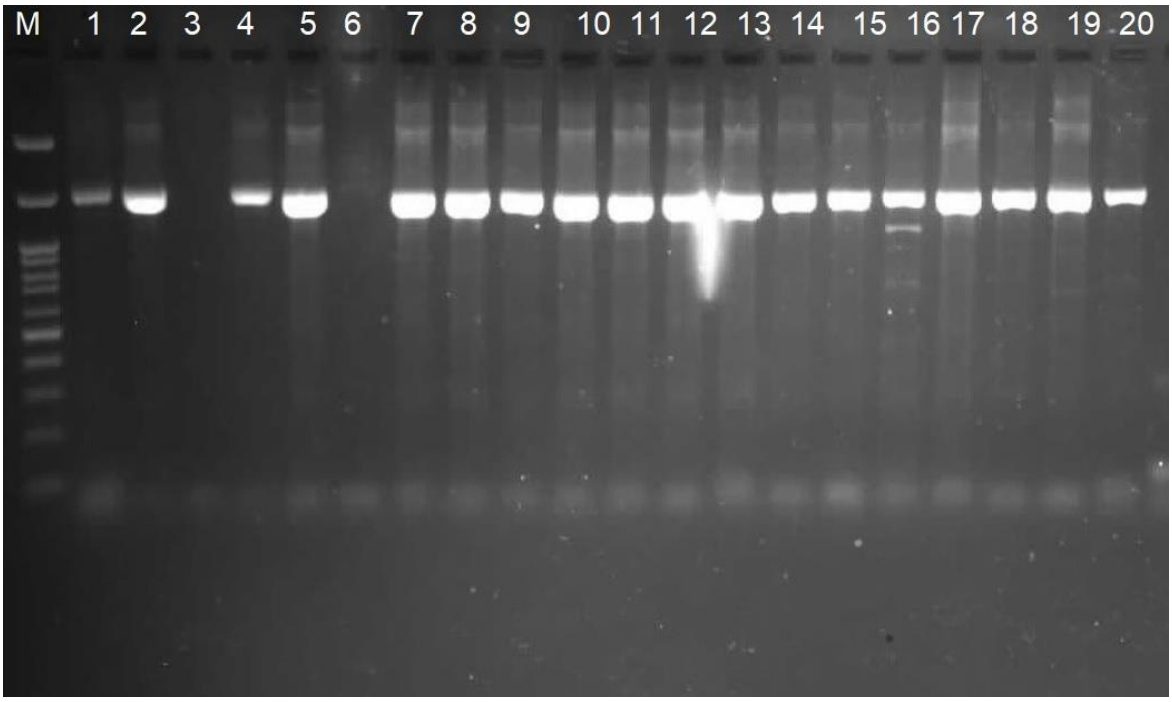
پس از اتمام آزمایش نتیجه با استفاده از نرم افزار دستگاه و آنالیز در کانال Green بررسی و با توجه به کنترل های مثبت و منفی مشخص می شود. لازم به ذکر است نمونه های مثبت دارای منحنی سیگموئید بوده و بخش پلاتو نیز معمولا دیده می‌شود.

- مقادیر Ct نمونه ها زیر ۳۰ مثبت در نظر گرفته می‌شود.

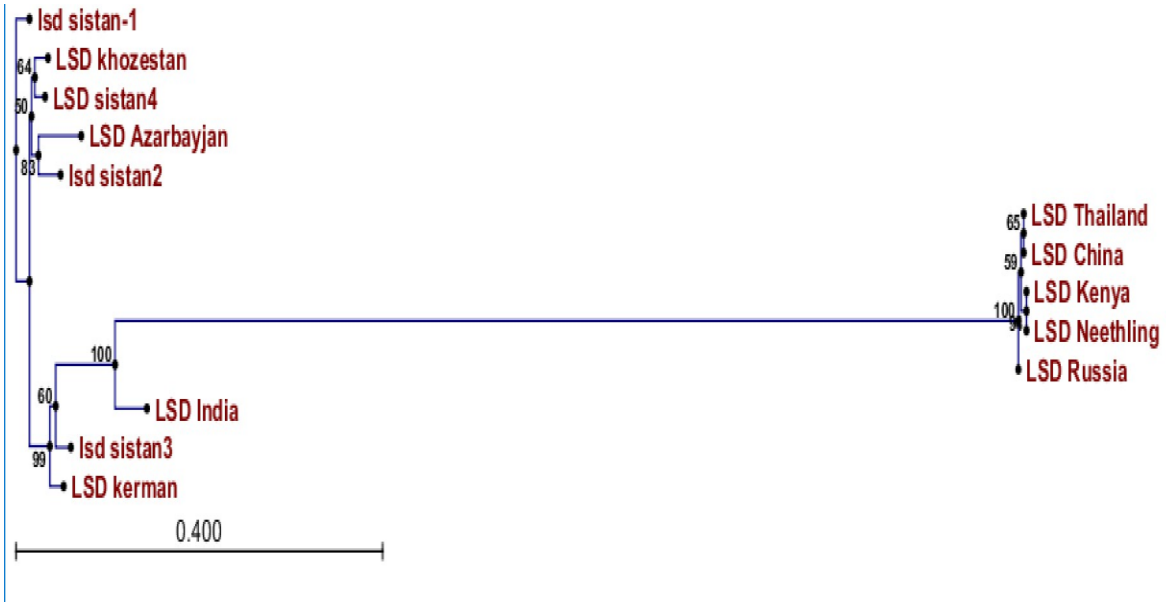
مقادیر Ct نمونه ها بین ۳۰ تا ۳۵ مشکوک و بالای ۳۵ منفی درنظر گرفته می‌شوند.

۳-نتایج :

از ۲۲۸ کانون رخداد مظنون به شیوع بیماری لامپی اسکین ۱۸۴ کانون در ۲۲ استان براساس نشانه های درمانگاهی مورد تایید قرار گرفته است . در ضمن نمونه ها جهت آزمایش به روش کمی پلی مراز Real Time PCR از ۹ استان کشور به تعداد ۳۴ نمونه در آزمایشگاه تشخیص اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی مورد آزمایش قرار گرفت . از تعداد ۳۴ نمونه، از ۲۶ نمونه در ۷ استان در آزمایش کمی پلی مراز مثبت شدند. نمونه های ارسالی از استان های مرکزی (۱ نمونه) خراسان رضوی (۲ نمونه) ، تهران (۱ نمونه) ، سیستان وبلوچستان (۲۳ نمونه) ، خوزستان (۱ نمونه) ، آذربایجان غربی (۲ نمونه) ، فارس (۲ نمونه) و کرمانشاه (۱ نمونه) ، مازندران (۱ نمونه) و سمنان (۱ نمونه) دریافت گردید. در آزمایش کمی پلیمراز Real Time PCR نمونه های استان های سیستان وبلوچستان (۱۹ نمونه) ، مازندران (۱ نمونه) ، خوزستان (۱ نمونه) ، آذربایجان غربی (۲ نمونه) ، فارس (۱ نمونه) و کرمانشاه (۱ نمونه) وسمنان (۱ نمونه) مثبت شدند.



شکل ۱: قطعه ژنی آماده شده جهت تعیین توالی - دراین تصویر M مارکر ۱۰۰bp، شماره های ۱و۲ کنترل های مثبت و شماره ۳ کنترل منفی تست را نشان می دهد .شماره های ۴ تا ۲۰ تعدادی از نمونه های آماده شده جهت تعیین توالی را نشان می دهد که اندازه باند حدود ۱۲۰۰ bp می باشد.



شکل ۲: درخت فیلوژنیکی رسم شده توالی‌های بدست آمده در این مطالعه

۴-بحث و نتیجه گیری :

ویروس بیماری لامپی اسکین **(LSDV)** یک ویروس **DNA** دو رشته ای است که متعلق به جنس کاپری پاکس ویروس **(Capripoxvirus)**از خانواده پاکس ویریده **(Poxviridae)** است . بیماری لامپی اسکین یکی از بیماری های مهم ویروسی است که به دلیل کاهش تولید شیر، افزایش میزان سقط جنین، کاهش وزن، افزایش حساسیت به عفونت های باکتریایی ثانویه و مرگ و میر بالا، خسارت های اقتصادی قابل توجهی ایجاد می کند **(۱۰)**. علائم بالینی بیماری لامپی اسکین در گاو تب و ضایعات پوستی ندولار است که می تواند در بدن پخش شود. لنفادنیت عمومی و ادم اندام ها نیز ممکن است رخ دهد.

اولین بار در سال ۱۹۲۹ ویروس بیماری لامپی اسکین در حیوانات مختلف در زامبیا و سایر کشورهای آفریقایی شناسایی شد **(۴)**. در سال ۱۹۸۹ ویروس بیماری لامپی اسکین در خاورمیانه مشاهده شد و از آن زمان تاکنون، چندین شیوع رخ داده است و خطر بومی شدن ویروس های بیماری لامپی اسکین در برخی از کشورهای منطقه وجود دارد **(۱۰, ۱۱-۱۳)**. قبل از سال ۲۰۱۲، این بیماری به طور پراکنده در خاورمیانه گزارش شده بود. با این حال، بروز این بیماری از سال ۲۰۱۲ در بسیاری از کشورها افزایش یافته است **(۵)**. شیوع ویروس های بیماری لامپی اسکین در سال ۲۰۱۴ در استان های شمال غربی ایران گزارش شد. این بیماری به دلیل مرگ و میر حیوانات، کاهش تولید شیر و هزینه های بهداشتی منجر به اثرات مخرب اقتصادی می شود **(۱۴)**. نتایج یک مطالعه دیگر نیز وجود ویروس های بیماری لامپی اسکین در شمال غرب ایران را نشان داد که از نظر ژنتیکی با بیش از ۹۹ درصد هویت آنها با یکدیگر مرتبط بودند **(۶)**. سمعیا یوسفی و همکاران ارتباط بین ویروس های بیماری لامپی اسکین جدا شده از مناطق مختلف ایران را بررسی کردند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک شباهت توالی بالایی بین ویروس های بیماری لامپی اسکین در ایران و جدایه‌های آفریقایی را نشان داد .آنها بیان کردند که ویروس های بیماری لامپی اسکین از عراق وارد ایران شده اند **(۷)** .

در مطالعه حاضر، ۲۲۸ رخداد مشکوک به بیماری لامپی اسکین مورد بررسی قرار گرفته است که با توجه به نشانه های درمانگاهی ۱۸۴ رخداد بیماری لامپی اسکین تایید شده است درضمن با استفاده از روش کمی زنجیره پلیمراز **(qPCR)** عفونت کاپری پاکس ویروس در ۲۶ رخداد بیماری لامپی اسکین تأیید گردید .در معاینه بالینی گاوهای آلوده به ویروس بیماری لامپی اسکین ، ندول‌های پوستی، بزرگ شدن غدد لنفاوی سطحی و کاهش اشتها متداول ترین نشانی های

درمانگاهی بوده است. علائم دیگر شامل تب، ادم در قسمت های مختلف بدن و ترشحات مخاطی بود. در تعداد زیادی از مطالعات نشانی های درمانگاهی مشابه ای را در عفونت های طبیعی یا تجربی گزارش کرده اند (۱۵). **PCR** روش تشخیصی متداول برای تشخیص این بیماری است (۱۶, ۱۷). تکنیک های مولکولی مانند **PCR** معمولی و روش کمی پلی مراز بی درنگ **(qPCR)** ثابت شده‌اند که دقیق‌تر، قابل اعتمادتر و سریع‌تر از روش‌های دیگر برای تشخیص **LSDV** هستند ژن **P32** یک پروتئین ساختاری مناسب برای تشخیص مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی است (۱۲). علاوه بر این، آنتی ژن **P32** نقش اساسی در پاتوژنز بیماری و تولید آنتی بادی علیه ویروس کاپری پاکس دارد (۱۸). اخیرا"در یک مطالعه ، گزارش شده است که ردیابی منشاء جدایه های ویروس بیماری لامپی اسکین استفاده از ژن **P32** می تواند در مطالعات فیلوژنتیک قابل اعتماد باشد (۱۹).

در این مطالعه با تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ۲۶ جدایه ویروس بیماری لمپی اسکین **(LSDV)** بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن **P32** نشان داده شده است جدایه ها بیشترین شباهت را با جدایه‌های آفریقایی ، مانند کنیا **(GenBank MN072619.1)** با ۹۷.۹٪ و آسیایی مانند هند (**GenBank MIN995838.1**) با ۹۸.۷٪ شباهت داشتند .احتمالاً منشأ جدایه های ایرانی هند است و ویروس های بیماری لامپی اسکین از هند وارد ایران شده اند .حمل و نقل غیرقانونی دام از مرزهای کشور بدون نظارت و کنترل مناسب می تواند دلیل این موضوع باشد .جدایه های ایران شباهت کمتری با کشورهای غرب و جنوب غربی ایران مانند ترکیه و عربستان داشتند .این نشان می دهد که این جدایه های ویروس از شرق کشور وارد ایران شده است.

نتایج این مطالعه نشان می دهد ویروس های بیماری لامپی اسکین همچنان در استان های مختلف ایران در گردش است، علاوه بر این، توالی های نوکلئوتیدی ژن **P32** ویروس بیماری لامپی اسکین در مورد ماهیت ژنوتیپی سویه های ویروس بیماری لامپی اسکین در گردش ایران را نیز ارائه می کند، این اطلاعات می‌تواند برای ردیابی منشأ ویروس‌ها و مطالعات آینده و تلاش‌ها در زمینه تولید واکسن علیه ویروس بیماری لامپی اسکین از اهمیت بالایی برخوردار باشد.

۵. مراجع

1. Coetzer J, Tuppurainen E. Lumpy skin disease. Infectious diseases of livestock. 2004;2:1268-76.
2. Mulatu E, Feyisa A. Review: Lumpy skin disease. J Vet Sci Technol. 2018;9(535):1-8.
3. Roche X, Rozstalnyy A, TagoPacheco D, Pittiglio C, Kamata A, Beltran Alcrudo D, et al. Introduction and spread of lumpy skin disease in South. East and Southeast Asia: Qualitative Risk Assessment and Management. 2020:1-183.
4. Tuppurainen E, Oura C. lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. Transboundary and emerging diseases. 2012;59(1):40-8.
5. Al-Salihi K, Hassan I. Lumpy skin disease in Iraq: study of the disease emergence. Transboundary and emerging diseases. 2015;62(5):457-62.
6. Sameea Yousefi P, Dalir-Naghadeh B, Mardani K, Jalilzadeh-Amin G. Phylogenetic analysis of the lumpy skin disease viruses in northwest of Iran. Tropical animal health and production. 2018;50:1851-8.
7. Ghalyanchilangeroudi A, Kafi ZZ, Rajeoni A, Ataii J, Sadri N, Zamani N, et al. Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of Lumpy Skin Disease Virus in Iran. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 2021;15(2).
8. Hedayati Z, Varshovi HR, Mohammadi A, Tabatabaei M. Molecular characterization of lumpy skin disease virus in Iran (2014–2018). Archives of Virology. 2021;166(8):2279-83.
9. . Bowden TR, Babiuk SL, Parkyn GR, Copps JS, Boyle DB. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. Virology. 2008;371(2):380-93.
10. MacLachlan N, Dubovi E. Parvoviridae. Fenner's Veterinary Virology. Academic Press, Elsevier Inc., USA; 2017.
11. Kasem S, Saleh M, Qasim I, Hashim O, Alkarar A, Abu-Obeida A, et al. Outbreak investigation and molecular diagnosis of Lumpy skin disease among livestock in Saudi Arabia 2016. Transboundary and emerging diseases. 2018;65(2):e494-e500.
12. OIE A. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, chapter 2.4.13. Office international des epizooties, Paris: OIE; 2017 p 1-14. 2017.
13. OIE. Code Manual,Chapter 7.8. Use of animals in research and education Paris: OIE Retrieved from https://wwwoieint/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_aw_research_educationhtm. 2021c.

14. Sameea Yousefi P, Mardani K, Dalir-Naghadeh B, Jalilzadeh-Amin G. Epidemiological study of lumpy skin disease outbreaks in North-western Iran. Transboundary and emerging diseases. 2017;64(6):1782-9.
15. Osuagwuh UI, Bagla V, Venter EH, Annandale CH, Irons PC. Absence of lumpy skin disease virus in semen of vaccinated bulls following vaccination and subsequent experimental infection. Vaccine. 2007;25(12):2238-43.
16. Zhao Z, Wu G, Yan X, Zhu X, Li J, Zhu H, et al. Development of duplex PCR for differential detection of goatpox and sheeppox viruses. BMC veterinary research. 2017;13:1-7.
17. Zhou T, Jia H, Chen G, He X, Fang Y, Wang X, et al. Phylogenetic analysis of Chinese sheeppox and goatpox virus isolates. Virology journal. 2012;9(1):1-8.
18. El-Kholy AA, Soliman HM, Abdelrahman KA. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of a recent lumpy skin disease virus incursion to Egypt. Arab journal of biotechnology. 2008;11(2):293-302.
19. Mafirakureva P, Saidi B, Mbanga J. Incidence and molecular characterisation of lumpy skin disease virus in Zimbabwe using the P32 gene. Tropical animal health and production. 2017;49(1):47-54.

Molecular Diagnosis and Phylogenetic Analysis of the Prevalence of Lumpy Skin Disease Virus in Iran

Lumpy skin disease (LSD) is a devastating viral disease in cattle that has recently spread from Africa to Middle Eastern countries. This study aimed to investigate the relationship between Lumpy Skin Disease Virus (LSDV) isolates from different regions of Iran and the origin and spread of these viruses. In this study, 184 out of 228 suspected outbreaks of Lumpy Skin Disease were confirmed based on clinical signs in 22 provinces. Samples were collected from 9 provinces, totaling 34 samples, and were tested using Real-Time PCR at the Veterinary Diagnostic Laboratory of Khorasan Razavi Province. Out of 34 samples, 26 samples from 7 provinces were positive in the Real-Time PCR assay. Fifteen Lumpy Skin Disease virus samples were subjected to Sanger-dideoxy direct sequencing. NCBI-Blast search of the examined sequences revealed that the most homologous sequences that most of these sequences aligned with were Lumpy Skin Disease Virus sequences (GenBank MN642592.1). The phylogenetic tree constructed from the obtained sequences showed the highest similarity to African isolates, such as Kenya (GenBank MN072619.1), and Asian isolates, such as India (GenBank MIN995838.1). It was concluded that the outbreak of Lumpy Skin Disease in Iran was likely caused by the introduction of Lumpy Skin Disease viruses from neighboring countries. The obtained P32 nucleotide sequence data is a valuable resource for understanding the genetic nature and molecular epidemiology of local Lumpy Skin Disease virus isolates.

Keywords: Lumpy Skin Disease, Phylogenetic analysis, P32 gene, Real-Time PCR.