JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره هفدهم، شماره اول، ۱۴۰۰، پیاپی ۴۲: ۳۷-۲۳

مقاله پژوهشی

بررسی فیلوژنیک ویروس طاعون نشخوار کنندگان کوچک شناسایی شده در دام های مبتلا در خراسان رضوی بر اساس دو ژن F و N

جواد انصاری[۱] ، افشین رئوفی*[۲] ،امید مددگار[۳]، حمیدرضا ورشویی[۴]، سعید بکایی[۵]

۱- دستیار تخصصی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

۲- استاد، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

۳- دانشیار، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

۴- استادیار، موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی، کرج

۵- استاد، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۸

چکیده

بیماری طاعون نشخوار کنندگان کوچک یک بیماری ویروسی بسیار واگیردار، کشنده و وخیم در نشخوار کننده کوچک می باشد. عامل بیماری، ویروس طاعون نشخوار کننده کوچک بوده(Peste des petits ruminants virus) که در جنس موربیلی ویروس قرار دارد. مطالعه حاضر جهت تعیین هویت ژنتیکی ویروس طاعون نشخوار کننده کوچک(PPRV) در حال گردش در استان خراسان رضوی انجام شد. اخیرا گزارشات متعددی از حضور بیماری در خراسان رضوی موجود است. در مطالعه پیش رو تعداد ۱۰۰ نمونه (خون، طحال و غدد لمفاوی) از دام های دارای علائم بالینی و تلف شده تهیه گردید. کلیه نمونه ها از نظر حضور ژن های نوکلئوکپسید (N) و فیوژن (F)و با روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفته و همه ی نمونه های مورد آزمون مثبت گزارش شدند. تعداد هفت نمونه از موارد مثبت به طور تصادفی انتخاب شده و جهت تعیین توالی ژن های N و F ارسال گردید. به طور کلی براساس آنالیز فیلوژنتیکی توالی ژن های N و F، ویروس طاعون نشخوار کننده کوچک به چهار دودمان تقسیم می شود. پس از تعیین هویت و آنالیز سکانس ژن های F و N و مقایسه آن با سایر سویه های موجود در بانک ژنی، برای هر ژن به طور مجزا درخت فیلو ژنتیکی رسم گردید. با اینکه هر یک از درخت های رسم شده برای ژن N و یا F دارای دو خوشه مجزا و زیر خوشه های متفاوت بودند اما کلیه سویه های مورد آزمون در دودمان چهار قرار گرفتند.

کلمات کلیدی: ویروس طاعون نشخوار کننده کوچک، تشخیص مولکولی، گوسفند، بز، خراسان رضوی

*نویسنده مسئول: افشین رئوفی

آدرس: دانشکده دامپزشکی، بخش بیماری های داخلی دام بزرگ، دانشگاه تهران

پست الکترونیک : raoofi@ut.ac.ir

مقدمه

بیماری طاعون نشخوار کننده کوچک(PPR) بیماری بسیار واگیر است که در نشخوار کنندگان کوچک اهلی و وحشی بیماری شدید و کشنده ایجاد می کند و به عنوان یک تهدید بزرگ در صنعت تامین گوشت در افریقا، خاورمیانه و اسیا مطرح می باشد(۹، ۱۹، ۵۶). تظاهرات بیماری شامل تب شدید، ریزش چشم و بینی که در ابتدا آبکی است و به مرور حالت موکوسی پیدا می کند و ممکن است باعث چسبندگی پلک ها یا ایجاد انسداد در بخشی از بینی شود. با ادامه تب حیوان دچار کم آبی شده و پنومونی و نکروز ، زخم و التهاب در دستگاه گوارش بروز پیدا کرده و در نهایت اسهال شدید باعث وخامت حال حیوان می شود(۱، ۳، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۲۹، ۳۹، ۴۴). واگیری حدود ۹۰٪ و مرگ و میر ۸۰٪-۷۰٪ می باشد و ظرف ۱۲-۱۰ روز بعد از شروع علائم مرگ رخ می دهد(۱۷). بز ها بیماری را شدیدتر و گوسفندان به طور ملایم تری بروز می دهند(۱۹). به نظر می رسد که گاو ها هم در اثر تماس مستقیم با دام آلوده یا تلقیح ویروس طاعون نشخوار کننده کوچک، بیماری را به صورت تحت بالینی بروز می دهند (۹، ۳۴، ۴۷). اما تاکنون دفع ویروس از گاو ها گزارش نشده و بنابراین در انتقال بیماری به نشخوار کننده کوچک نقشی ندارند(۴۲). عامل بیماری ویروس طاعون نشخوار کننده کوچک(PPRV) بوده که در جنس موربیلی ویروس و خانواده پارامیکسو ویریده قرار دارد(۴، ۲۳). PPRV دارای پوشینه است و از این نظر همچون سایر ویروس های دارای پوشینه نسبت به تغییرات محیطی حساس می باشد. ویروس در بیرون از بدن میزبان به سرعت غیر فعال می شود و لذا برای انتقال عفونت تماس مستقیم بین دام سالم و دام آلوده ضروری می باشد(۳۳). ژنوم ویروس RNA تک رشته ای با سنس منفی است که شش پروتئین ساختاری: فسفوپروتئین (P)، نوکلئوکپسید(N)، فیوژن (F)، ماتریکس(M)، هماگلوتینین(H) و پلیمراز(L) ، و سه پروتئین غیر ساختاری به نام های W، V و C را ترجمه می کند(۳۷). پروتئین های ویروسی دارای نقش های چندگانه در بیماری زایی و مهار و خنثی سازی پاسخ های ضد ویروسی میزبان دارند(۵۸). پروتئین های ساختاری ویروسی PPRV سرکوب ایمنی در میزبان طبیعی باعث گسترش عفونت و افزایش تکثیر ویروسی شده(۲۴، ۳۸) و همچنین قادرند باعث القای آپوپتوز(۳۶) و سرکوب پاسخ آنتی بادی میزبان شوند(۴۳). پروتئین N مهمترین پروتئین PPRV است که نقش اصلی در سرکوب مسیر سلولی IRF3 دارد و متعاقبا با مهار تشکیل مجتمع TBK1-IRF3، اینترفرون نوع I تولید نمی شود(۵۸).

ویروس مذکور تک سروتیپی بوده و به چهار دودمان مجزا تقسیم می شود(۳۰). دسته I و II در افریقای مرکزی و غربی، دسته III در شرق افریقا و جنوب خاورمیانه و دسته IV در آسیا گزارش شده است(۳۷، ۳۸). بیماری PPR با نام های طاعون بز(goat plague)، طاعون کاذب، ابونینی(abunini)، کاتا (kata) و پنوموانتریت (Pneumonia enteritis complex) نیز شناخته می شود(۱). نام طاعون نشخوار کننده کوچک از طاعون گاوی اقتباس شده است و نشان دهنده این است که از نظر بالینی به شدت شبیه طاعون گاوی می باشد(۴۵، ۴۶). در موارد حاد به خصوص در مواردی که ضایعات ظرف ۲-۳ روز خوب نشوند و یا در مواردی که نواحی نکروز وسیع باشد و عفونت باکتریایی سبب تنفس بدبو در حیوان شود، پیش آگهی بیماری ضعیف است (۴۸، ۵۳).

بیماری در جنوب غربی و مرکز آسیا و همچنین خاورمیانه، خاور نزدیک و شبه جزیره عربی اندمیک است(۱۹). طی سال های اخیر موارد بیماری افزایش پیدا کرده و این افزایش شیوع PPR منجر به وارد شدن صدمات اقتصادی می شود(۱۲، ۴۲). نشخوار کنندگان کوچک به طور معنی داری در اقتصاد جوامع روستایی کشور های درحال توسعه نقش دارند و عفونتهای ثانویه و شرایط نگهداری و ضعف مدیریتی منجر به وخامت شرایط می شود(۳۵).

براساس آخرین گزارش OIE، ایران به ترتیب ۵٪ و ۱۰٪ جمعیت بز و گوسفند خاورمیانه را دارا می باشد؛ و علی رغم استفاده از واکسن زنده ی تخفیف حدت یافته طی ۱۶ سال اخیر موارد وقوع همواره بیش از ۳۲٪ بوده است(۱۷). اولین گزارش وقوع بیماری در ایران در سال ۱۹۹۵ ثبت شد(۴۹). اغلب مطالعات انجام شده در ایران براساس روش های سرولوژی بوده و مطالعات مولکولی اندکی در این زمینه انجام شده و اغلب محدود به ژن F می باشد(۲۱). هدف از انجام مطالعه حاضر ردیابی ژن های F و N در نمونه های جدا شده از دام های دارای علائم بالینی و نمونه های بافتی عقده های لمفاوی، ریه و طحال دام های تلف شده متعاقب بیماری PPR از دامداری های استان خراسان رضوی، و مقایسه فیلوژنتیکی سویه های مورد آزمون با سایر سویه های موجود در بانک ژنی می باشد.

مواد و روش کار:

نمونه گیری: نمونه گیری از اسفند ۹۶ تا اسفند ۹۷ انجام شد؛ و تعداد ۱۰۰ نمونه (۵۰ نمونه از گوسفند و ۵۰ نمونه از بز) از گله های دارای علائم بالینی در استان خراسان رضوی تهیه گردید. از ۵۰ نمونه گوسفند نه مورد تلف شده بودند و علاوه بر تاریخچه بیماری که شامل تب و اسهال شدید بود، در کالبدگشایی پنومونی و زخم در طول دستگاه گوارش رویت شد. از مجموع ۴۱ گوسفند زنده، ۱۱ گوسفند دارای اسهال شدید و تب، هشت گوسفند دارای ریزش چشم و بینی به همراه زجر تنفسی و ۲۲ گوسفند دارای تب و ریزش چشم و بینی بودند. از مجموع ۵۰ بز مورد مطالعه ۱۳ بز متعاقب اسهال شدید تلف شده بودند و در کالبدگشایی زخمهای وسیع گوارشی و نکروز و پنومونی را نشان دادند. از ۳۷ بز زنده چهار بز دارای ریزش چشم و بینی و تب، ۱۰ بز دارای ریزش چشم و بینی و زجر تنفسی و ۲۳ بز دارای تب بالا و اسهال سدید بودند. از کلیه موارد دارای علائم بالینی و دام های تلف شده نمونه اخذ گردید. نمونه ها شامل خون همراه با EDTA به عنوان ماده ضد انعقاد از ورید وداج دام های زنده دارای علائم بالینی اخذ گردید. نمونه های بافتی شامل طحال،ریه و غدد لمفاوی مزانتر، مدیاستن و عقب حلقی- از دام های تلف شده تهیه شد. هر نمونه به طور جداگانه کدگذاری شد و در مجاورت یخ به سرعت به آزمایشگاه ارسال گردید. کلیه نمونه ها تا قبل از استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آماده سازی نمونه: کلیه نمونه های بافتی با استفاده از روش های هموژن سازی یکنواخت شدند.

استخراج RNA: استخراج RNA با استفاده از کیت سیناکلون(سیناکلون، تهران،ایران) و طبق پروتکل سازنده انجام شد

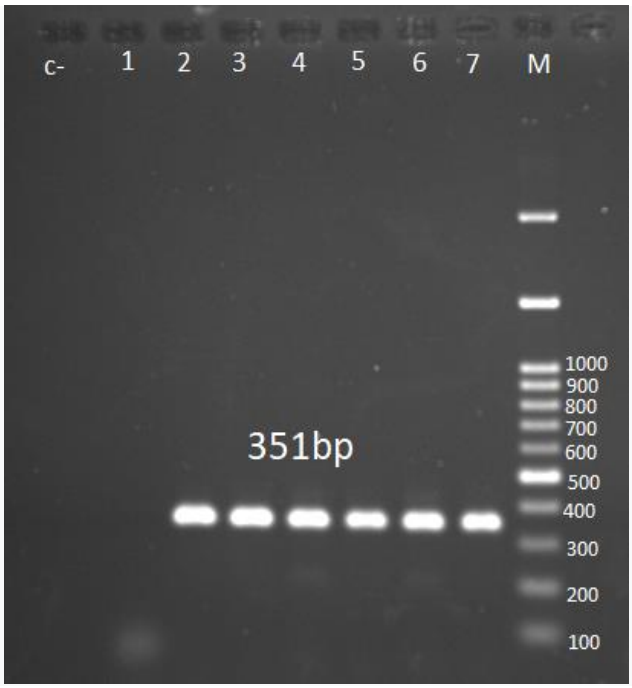
آماده سازی cDNA: تهیه cDNA با استفاده از کیت فرمنتاز(فرمنتاز،لاتویا، امریکا) انجام شد. مقدار ۱۰ میکرو لیتر RNA استخراج شده، ۱ میکرو لیتر رندوم هگزامر، ۴ میکرو لیتر بافر ×۵، ۱ میکرو لیتر محدود کننده آرناز، ۱ میکرو لیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس ، ۲ میکرو لیتر dNTP و ۳میکرولیتر آب

مقطررا طبق پروتکل درون ترموسایکلر قرار داده شده و در نهایت cDNA تولید شده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

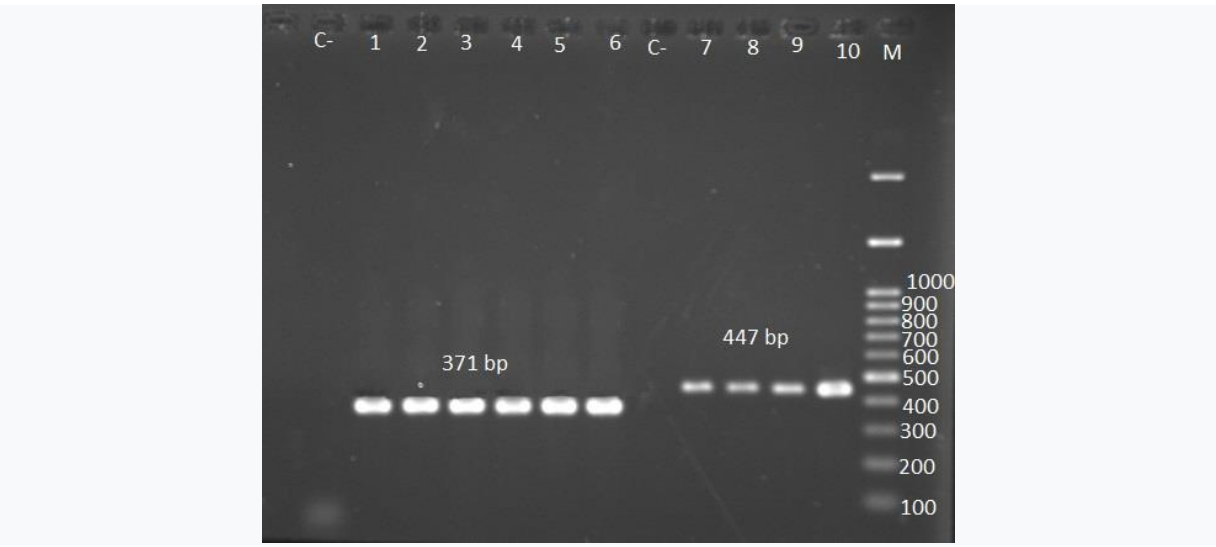
واکنش زنجیره ای پلیمراز: در این مطالعه برای تکثیر ژن N از پرایمر های (5´GTCTCGGAAATCGCCTCACAGACT3´)NP3 و (5´CCTCCTCCTGGTCCTCCAGAATCT3´)NP4 که یک قطعه ی ۳۵۲ جفت بازی را کد می کند(۱۲) و برای تکثیر ژن F از پرایمر F1b (5´ AGTACAAAAGATTGCTGATCACAGT 3´) و (5´GGGTCTCGAAGGCTAGGCCCGAATA3´)F2b که یک قطعه ی ۴۴۷ جفت بازی را کد می کند استفاده شد. برای اطمینان بیشتر و در مواردی که نتیجه منفی یا ضعیف بود برای تکثیر ژن F از یک پرایمر دیگر به نام (5´ATCACAGTGTTAAAGCCTGTAGAGG3´)F1 و (5´GAGACTGAGTTTGTGACCTACAAGC3´)F2 استفاده شد که یک قطعه ۳۷۱ جفت بازی را کد می کرد(۲۲).

محتویات محلول PCR شامل: ۱۲ میکرو لیتر مسترمیکس(Master mix)، ۶ میکرو لیتر آب فاقد نوکلئاز، یک میکرو لیتر پرایمر رفت (۱۰ pmol/ml)، یک میکرو لیتر پرایمر برگشت (۱۰pmol/ml) و ۵ میلی لیتر cDNA.

تکثیر cDNA توسط دستگاه ترموسایکلر و با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه برای مرحله شروع واسرشتی، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت مرحله واسرشت، ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای مرحله ی اتصال پرایمر(برای هر سه پرایمر)، ۷۲ درجه سانتی گراد برای طویل شدن برای ۳۵ سیکل و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه برای طویل شدن نهایی انجام شد. و محصول نهایی به کمک ژل آگارز ۲٪ ، رنگ اتیدیوم برماید و با تابش اشعه ماورا بنفش مورد مشاهده قرار گرفت(تصاویر ۱ و ۲).



تصویر ۱. نتایج الکتروفورز ژل آگاروز محصولات PCR(351 bp) که با استفاده از پرایمرهای NP3 و NP4 تکثیر شدند. :Mمارکر ۱۰۰ bp، :C کنترل منفی، ۷-۱: نمونه ها



تصویر ۲. نتایج الکتروفورز محصولات PCR قطعه ی ۳۷۱ bp بااستفاده از از پرایمرهای F1 و F2 و قطعه ی ٤٤٧ bp با استفاده از پرایمر های F1b و F2b تکثیر گردیدند. :Mمارکر ۱۰۰ bp، :Cکنترل منفی، ٦-۱ و ۱۰-۷:نمونه ها

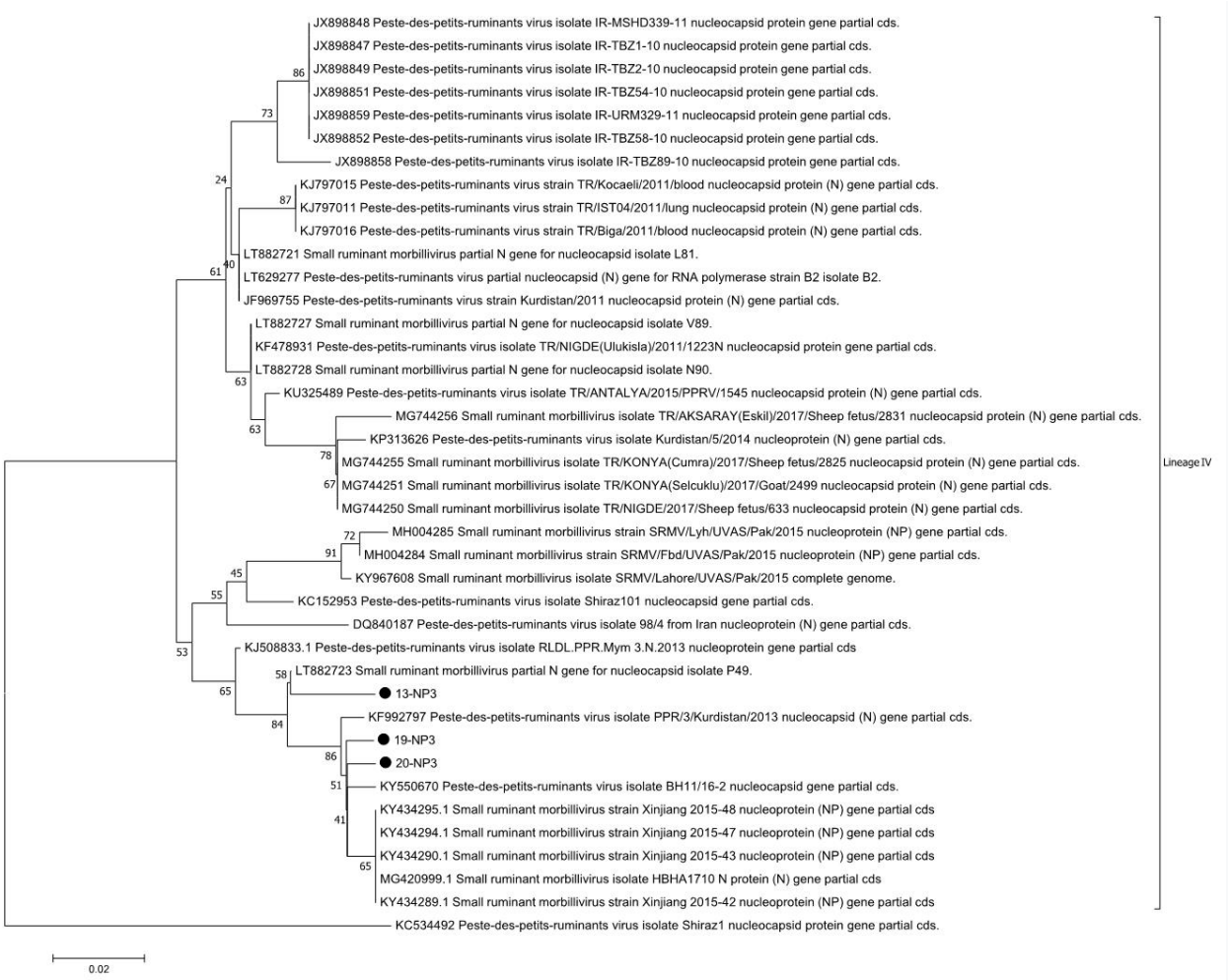
آماده سازی نمونه ها جهت توالی یابی: در ابتدا تعداد هفت محصول PCR به طور تصادفی انتخاب شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR و ۱۰ میکرولیتر آب استریل درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و پس از مخلوط کردن، درب تیوب ها با پارافیلم بسته شد. در دو میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری دیگر به طور مجزا ۵۰ میکرولیتر پرایمر رفت(۴۵ میکرولیتر آب استریل و ۵ میکرولیتر پرایمر رفت) و در دیگری ۵۰ میکرولیتر پرایمر برگشت (۴۵ میکرولیتر آب استریل و ۵ میکرولیتر پرایمر برگشت) ریخته شد و درب میکروتیوب ها با پارافیلم بسته شد. نمونه جهت تعیین توالی و تایید هویت در مجاورت یخ به شرکت تکاپوزیست ارسال شد.

نتایج:

ترسیم درخت فیلوژنتیک: پس از خالص سازی، نمونه ها با روش تعیین توالی خودکار، تعیین توالی و همتراز شدندو نتایج توالی های بدست آمده به وسیله نرم افزار chromas ویرایش گردیدند و در نهایت در سایت بانک ژنی (NCBI) به وسیله ی نرم افزار BLAST با سویه های موجود در بانک ژنی همتراز بلاست گردیدند تا هویت ویروس طاعون نشخوار کنندگان کوچک تایید گردد. در نهایت درخت فیلوژنیکی رسم شد. درخت فیلوژنی برای ژن های F و N با استفاده از روش اتصال همسایه(neighbor-joining) با تکرار بوت استرپ(bootstrap) ۱۰۰۰ و با استفاده از نرم افزار MEGA 7 و با پارامتر Kimura-2 رسم گردید(۳۱).

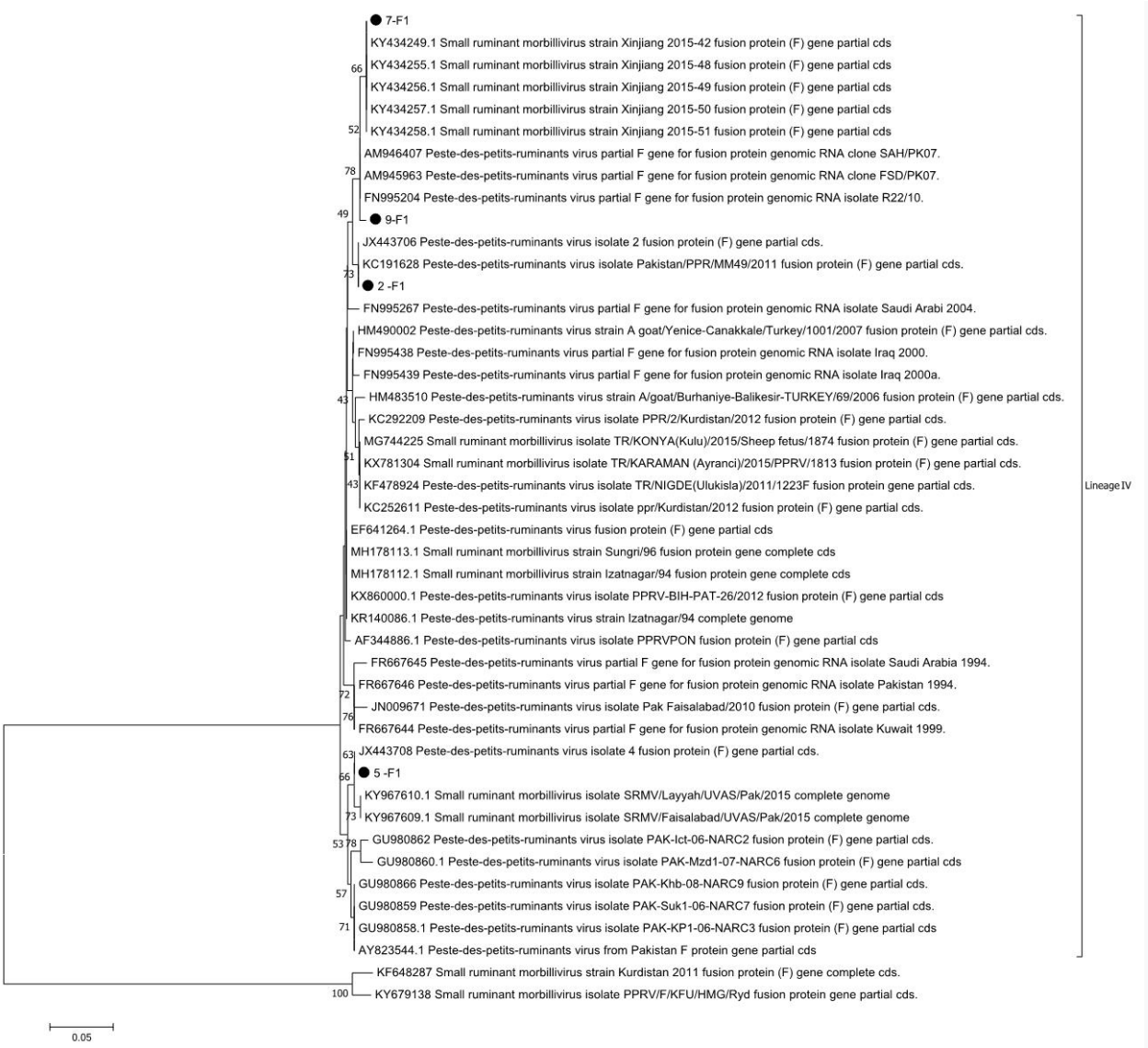
آنالیز فیلوژنیکی: براساس توالی های بدست آمده برای ژن N درخت رسم شد که دو شاخه ی جداگانه را نشان می داد(تصویر ۳). شاخه ی اول متشکل از سویه های IR-MSHD339-11(ایران)،IR-TBZ1-10(ایران)،IR-TBZ2-10(ایران)،IR-TBZ54-10(ایران)،IR-URM329-11(ایران)، IR-TBZ58-10(ایران)،IR-TBZ89-10(ایران)، TR/Kocaeli/2011 (ترکیه)،TR/IST04/2011(ترکیه)،TR/Biga/2011 (ترکیه)،isolate L81(عراق)، B2 isolate B2(عراق، Kurdistan/2011(عراق)،V89 (عراق)، TR/NIGDE(Ulukisla)/2011/1223 (ترکیه) ،N90(عراق)،

TR/ANTALYA/2015/PPRV/1545(ترکیه)، Shiraz101(ایران)، 98/4(ایران)، TR/AKSARAY(Eskil)/2017(ترکیه)، RLDL.PPR.Mym 3.N.2013(بنگلادش)، Kurdistan/5/2014(عراق)، P49(عراق)، **13-NP3**(ایران)، TR/KONYA(Cumra)/2017(ترکیه)، PPR/3/Kurdistan/2013()، **19-NP3**(ایران)، **20-NP3**(ایران)، TR/KONYA(Selcuklu)/2017(ترکیه)، BH11/16-2(ایران)، Xinjiang 2015-48(چین)، TR/NIGDE/2017/Sheep fetus/633(ترکیه)، Xinjiang 2015-47(چین)، SRMV/Lyh/UVAS/Pak/2015(پاکستان)، HBHA1710(چین)، Xinjiang 2015-43(چین)، SRMV/Fbd/UVAS/Pak/2015(پاکستان)، Xinjiang 2015-42(چین) بود و در شاخه دوم تنها سویه SRMV/Lahore/UVAS/Pak/2015(پاکستان)، Shiraz1 از ایران قرار داشت.



تصویر ۳. درخت فیلوژنیک رسم شده براساس توالی های ژن N و رابطه ی بین سویه های مورد مطالعه با سویه های ایران و سایر کشورها. برای رسم این درخت از نرم افزار Mega 7 و با روش neighbor-joining و با استفاده از پارامترهای Kimura2 و بوت استرپ ۱۰۰۰، استفاده شد. سویه های ردیابی شده در مطالعه ی حاضر با دایره ی مشکی نشان داده شده اند. خطوط مقیاس نشاندهنده ی فاصله ی بین توالی هاست.

در درختی که براساس اطلاعات بدست آمده از توالی های ژن F رسم گردید(تصویر ۴)، مجددا دو شاخه مجزا مشاهده شد. شاخه اول شامل سویه های 7-F1(ایران)، Xinjiang 2015-42 (چین)، Xinjiang 2015-48(چین)، Xinjiang 2015-49(چین)، Xinjiang 2015-50(چین)، 2015-51(چین)، clone SAH/PK07 (پاکستان)، clone FSD/PK07(پاکستان)، R22/10(ایران)، 9-F1(ایران)، 2 fusion protein (ایران)، Pakistan/PPR/MM49/2011(پاکستان)، F1- 2(ایران)، Saudi Arabi 2004(عربستان سعودی)، Agoat/YeniceCanakkale/Turkey/1001/2007 (ترکیه)، Iraq 2000(عراق)، Iraq 2000a(عراق)، A/goat/Burhaniye-Balikesir-TURKEY/69/2006(ترکیه)، PPR/2/Kurdistan/2012(عراق)، TR/KONYA(Kulu)/2015/Sheep fetus/1874(ترکیه)، TR/KARAMAN (Ayranci)/2015/PPRV/1813(ترکیه)، TR/NIGDE(Ulukisla)a/2011/1223F(ترکیه)، ppr/Kurdistan/2012 (عراق)، fusion protein (F) gene partial cds(هند)، Sungri/96(هند)، Izatnagar/94 fusion protein gene complete cds (هند)، PPRV-BIH-PAT-26/2012(هند)، Izatnagar/94 complete genome(هند)، PPRVPON(هند)، Saudi Arabia 1994(عربستان سعودی)، Pakistan 1994(پاکستان)، Pak Faisalabad/2010(پاکستان)، Kuwait 1999(کویت)، 4 fusion protein(ایران)، 5-F1(ایران)، SRMV/Layyah/UVAS/Pak/2015(پاکستان)، SRMV/Faisalabad/UVAS/Pak/2015(پاکستان)، PAK-Ict-06-NARC2(پاکستان)، PAK-Mzd1-07-NARC6(پاکستان)، PAK-Khb-08-NARC9(پاکستان)، PAK-Suk1-06-NARC7(پاکستان)، PAK-KP1-06-NARC3(پاکستان)، Pakistan F protein gene(پاکستان) در خوشه اول و سویه های Kurdistan 2011(عراق)، PPRV/F/KFU/HMG/Ryd(عربستان سعودی) در خوشه دوم قرار داشتند.



تصویر ٤. درخت فیلوژنیک رسم شده براساس توالی های ژن F و رابطه ی بین سویه های مورد مطالعه با سویه های ایران و سایر کشورها. برای رسم این درخت از نرم افزار Mega 7 و با روش neighbor-joining و با استفاده از پارامترهای Kimura2 و بوت استرپ ۱۰۰۰، استفاده شد. سویه های ردیابی شده در مطالعه ی حاضر با دایره ی مشکی نشان داده شده اند. خطوط مقیاس نشاندهنده ی فاصله ی بین توالی هاست.

بحث:

بیماری طاعون نشخوار کنندگان کوچک یک بیماری حاد و بسیار واگیر دار است از نظر اقتصادی در صنعت پرورش نشخوار کننده کوچک حائز اهمیت می باشد. با توجه به ریشه کنی موفق طاعون گاوی، سازمان غذا و کشاورزی(FAO) و سازمان بهداشت جهانی و سلامت حیوانات (OIE) برنامه ریزی کرده اند تا سال ۲۰۳۰ طاعون نشخوارکندگان کوچک را نیز ریشه کن کنند. تا مدت ها تصور بر این بود که PPR محدود به کشورهای غرب افریقا می باشد اما با گذشت زمان سرتاسر افریقا به جز کشورهای جنوبی، از نواحی مرکزی افریقا تا شمال اکوادور و همینطور خاورمیانه و آسیا را در بر گرفت(۹، ۱۶، ۳۰، ۴۲، ۵۲). PPR به عنوان یکی از مهمترین عوامل محدود کننده صنعت

پـــــرورش نشـــــخوارکننده کوچـــــک مطـــــرح می باشد(۵۱). اولین گـزارش بـالینی از بیمـاری در سـال ۱۹۴۰ و در غـرب افریقـا رخ داد، امـا تـا ۱۹۷۹ ماهیـت ویروس شناسـایی نشـد(۲۳). بیمـاری در حالـت معمـول گوسـفند و بـز و در برخـی مـوارد نشـخوارکنندگان کوچک وحشی و شتر را درگیر مـی کنـد(۲، ۸). عامـل مسبب بیماری، ویروس طاعون نشخوار کننـده کوچـک می باشد که دارای پوشینه و کپسید مـارپیچی اسـت کـه ژنـوم RNA تـک رشـته ای سـنس منفـی را در بـر می گیرد، و در جنس مـوربیلی ویـروس قـرار دارد(۹). ژنوم ویروس PPR، ۶ پروتئین ساختاری (M, N, H, P, F, L) و ۳ پـروتئین غیـر سـاختاری(C, V, W) را تولیـد می کند؛ کـه سـه ژن سـاختاری H، F و N در تشـخیص مولکولی حائز اهمیـت مـی باشـند(۳۰، ۳۲). پـروتئین N دارای نقش اصلی در سرکوب ایمنی میزبان اسـت(۵۸). علی رغم تک سروتیپی بودن ویـروس مـذکور(۷)، ایـن ویروس براساس آنالیز تـوالی ژن هـای N و F بـه چهـار دسـته جداگانـه تقسـیم مـی شـود(۱۲، ۲۸، ۵۰، ۵۴). بـا توجه به گزارشات اخیـر از منـاطق غیـر منتظـره بـه نظـر می رسد که ویروس در حال گردش بوده و بـه سـرعت در حال گسترش می باشد(۹).

این بیماری از سودان (۵۳)، کنیا ، اوگاندا و اتیوپی (۴۵) گـزارش شـده اسـت PPR .در شـبه جزیـره عربسـتان، خاورمیانه و در شبه قاره هنـد آنـدمیک مـی باشـد (۵۱). بیماری از افغانسـتان بـه کشـورهای همسـایه مثـل اتحـاد جماهیر شوروی سابق و چین وارد شده است (۱۱).

حضور بیمـاری در شـبه جزیـره عربـی و در کشـورهایی مانند ایران، عراق، اسرائیل، اردن، کویت، لیبـی، عمـان، عربسـتان سـعودی، امـارات و یمـن ثابـت شـده اسـت و سـوریه و ترکیـه از نظـر سـرولوژیک مثبـت گـزارش شده اند (۳۳). در عربستان سـعودی در مطالعـه النعـیم و همکاران در سال ۲۰۰۰ شـیوع PPRV انـدک بـود(۸). اما در آپریل ۲۰۰۲ مرگ و میر۱۰۰ درصد در گوسـفند و بـز گـزارش شـد و پـس از آن نیـز در بررسـی هـای سرولوژیک شیوع بیشـتری از بیمـاری گـزارش گردیـد (۵، ۱۹). حساسیت شتر تک کوهانه نیـز بـه عفونـت بـه PPRمثبـت اعـلام شـده اسـت (۲۷). عبدالـه پـور و همکاران در سال ۲۰۰۶در استان تهران ایران گزارشی از یک درگیری با میزان بـالای مـرگ ومیـردر یـک گلـه گوسفند داشتند.یافتـه هـای اسـیب شناسی،سـرم شناسـی وخون شناسی وجودطـاعون نشـخوارکنندگان کوچـک را تاییـد کـرد(۱). اسـماعیل زاده و همکـاران در سـال ۲۰۱۱ مطالعه ای تحت عنوان تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ویروس طاعون نشخوارکنندگان (PPRV) جدا شده در ایران بر اساس داده های توالی جزئی از ژن فیـوژن (F) انجام دادند. تجزیه و تحلیـل تـوالی سـویه هـا نشـان داد که جدایه های ایرانی دارای بالاترین درجـه از همسـانی با اکثریت سویه ها به جز جدایـه هـا نیجریـه و ICV89 بودند(۲۱). با توجه به اینکه این کار تحقیقـاتی در سـال ۲۰۰۹ و تنها بر روی ژن (F) صـورت گرفتـه لـذا انجـام طرح تحقیقاتی حاضر با تکیه بر دو ژن (F)و (N) دارای اهمیت و نوآوری می باشد. در سـال ۲۰۰۸ ورشـویی و همکـاران موفـق بـه تولیـد واکسـن طـاعون نشـخوار کنندگان کوچک با استفاده سویه تخفیف حـدت یافتـه در کشـت سـلولی ورو در ایـران شـدند.در ایـن مطالعـه سویه ی نیجریه ۷۵/۱ مورد استفاده قرار گرفت(۵۵). در بررسـی کـه در سـال ۲۰۱۳ توسـط داوری و همکـاران تحت عنوان تجزیه و تحلیل ژنتیکی از عوامـل ویروسـی مولد ایجـاد پوسـته در پـوزه نشـخوارکنندگان کوچـک انجـام گردیـد مشـخص شـد کـه ۵۰٪مـوارد مربـوط بـه اکتیمای واگیـر،۸٪آبلـه و۲٪مربـوط بـه طـاعون نشـخوار کنندگان کوچک بوده است(۱۵).

در مطالعه ای در خوزستان، زکیان و همکاران اقدام به بررسی شیوع سرمی ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک در جمعیت گاو و گوسفند و شترهای استان کردند و به روش الایزا و خنثی سازی ویروس وجود آنتی بادی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاکی از آن بود که از ۱۵۰ نمونه خون شتر تنها یک مورد از نظر ویروس مثبت شد اما تمام نمونه های سرم گوسفند مثبت اعلام شدند(۵۷). منیر و همکاران در سال ۲۰۱۴ پس از بررسی گزارشات متعدد از الودگی های ایجاد شده در حیات وحش به این موضوع اشاره کردند که تمام ویروس های طاعون نشخوار کنندگان کوچک جدا شده از حیات وحش مربوط به دودمان ۴بوده است(۴۰).

در مطالعه ای دیگر که توسط گولر و همکاران در راستای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ویروس طاعون نشخوارکنندگان از شیوع بیماری در ترکیه در طول ۲۰۰۸-۲۰۱۲ انجام شد انها به این نکته اشاره شد که تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ویروس ها حاکی از این است که تمام ویروس ها،متعلق به دودمان IV بوده که قبلا در ترکیه جدا شده است. هویت توالی نوکلئوتیدی در میان ۱۶ ویروس ۹۹,۱٪ -۱۰۰٪ بود(۳۲). در مطالعه دیگری که توسط مونیر و همکاران در سال ۲۰۱۲ جهت تشخیص و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ویروس طاعون نشخوارکنندگان از شیوع بیماری در پنجاب، پاکستان انجام اشاره کردند که نمونه پاکستان با چین، تاجیکستان و سویه ایرانی، که احتمالا نشان دهنده الگوی جغرافیایی واقعی گردش ویروس قرار گرفتند بسیار همسانی دارد(۳۸). در حال حاضر بیماری در افریقا، آسیا، خاورمیانه و ترکیه به حالت اندمیک در آمده و گزارش هایی از وقوع بیماری در گرجستان و مغولستان نیز موجود است(۹، ۱۳، ۴۱).

نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر هفت سویه جدید از ویروس طاعون نشخوار کنندگان کوچک که با اسامی-19 ,13-NP3 NP3, 20-NP3, 7-F1, 9-F1, 2 -F1 5 -F1 نامگذاری شدند، شناسایی و گزارش گردید. سویه های تعیین هویت شده براساس ژن N با زیر شاخه ها و سویه های کشورهای ایران، ترکیه، عراق، پاکستان، چین و بنگلادش و براساس ژن F با زیر شاخه ها و سویه های کشور های ایران، چین، پاکستان، عربستان سعودی، ترکیه، هند و عراق دارای قرابت بودند. با توجه به اطلاعات بدست آمده از بخشی از ژنوم ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک که همگی متعلق به دودمان چهار بودند بوده و قبلا هم در منطقه موجود بوده روشن است که ویروس جدیدی سبب اپیدمی های اخیر نبوده و در واقع همان ویروسهای سابق بوده که در حال گردش در منطقه هستند. این امر نشان دهنده ی عدم رعایت اصول قرنطینه ، نقل و انتقال دامهای منطقه ای و عدم رعایت موارد بهداشتی از قبیل قاچاق دام زنده، جدا نکردن دام آلوده ، بازار های فروش دام زنده و ..... که سبب انتقال ویروس در یک منطقه میگردند عامل اساسی بوده است.

منابع

1. Abdollahpour, G., Raoofi, A., Najafi, J., Sasani, F., & Sakhaie, E. (2006). Clinical and Para-clinical Findings of a Recent Outbreaks of Peste des Petits Ruminants in Iran. *Journal of Veterinary Medicine, Series B, **53:** 14-16* .
2. Abraham, G., Sintayehu, A ,.Libeau, G., Albina, E., Roger, F., Laekemariam, Y., . . . Awoke, K. (2005). Antibody seroprevalences against peste des petits ruminants (PPR) virus in camels, cattle, goats and sheep in Ethiopia. *Preventive veterinary medicine, **70:*** 51-57.
3. Abubakar ,M., Jamal, S. M., Hussain, M., & Ali, Q. (2008). Incidence of peste des petits ruminants (PPR) virus in sheep and goat as detected by immuno-capture ELISA (Ic ELISA). *Small ruminant research, **75:*** 256-259 .
4. Adombi, C. M., Lelenta, M., Lamien, C. E., Shamaki, D., Koffi, Y. M., Traoré, A., . . . Djaman, J. A. (2011). Monkey CV1 cell line expressing the sheep–goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *Journal of virological methods, **173:*** 306-313 .
5. Al-Dubaib, M. A. (2008). Prevalence of Peste despetitis ruminants Infection in Sheep and Goat Farms at the Central Region of Saudi Arabia. *Research journal of Veterinary Sciences*, **1:** 67-70.
6. Alemu, B., Gari, G., Libeau, G., Kwiatek, O., Kidane, M., Belayneh, R., . . . Abdi, R. D. (2019). Molecular detection and phylogenetic analysis of Peste des petits ruminants virus circulating in small ruminants in easternAmhara region, Ethiopia. *BMC veterinary research, **15:*** 1-9.
7. Ali, W. H., Osman, N. A., Asil, R. M., Mohamed, B. A., Abdelgadir, S. O., Mutwakil, S. M., & Mohamed, N. E. (2018). Serological investigations of peste des petits ruminants among cattle in theSudan. *Tropical Animal Health and Production, **51:*** 655-659 .
8. Al-Naeem, A., Abu Elzein, E. M., & Al-Afaleq, A. I. (2000). Epizootiological aspects of peste des petits ruminants and rinderpest in sheep and goats in Saudi Arabia. Rev Sci Tech, 19 :855-858.
9. Baazizi, R., Mahapatra, M., Clarke, B. D., Ait-Oudhia, K., Khelef, D., & Parida, S. (2017). Peste des petits ruminants (PPR): A neglected tropical disease in Maghreb region of North Africa and its threat to Europe. *PloS one, **12*** **:** e0175461 .
10. Balamurugan, V., Krishnamoorthy, P., Veeregowda, B. M., Sen, A., Rajak, K. K., Bhanuprakash, V., . . . Prabhudas, K. (2012). Seroprevalence of Peste des petits ruminants in cattle and buffaloes from Southern Peninsular India. *Tropical Animal Health and Production, **44*** **:** 301-306 .
11. Banyard, A. C., Parida, S., Batten, C., Oura, C., Kwiatek, O., & Libeau, G. (2010). Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *Journal of general virology, **91*** **:** 2885-2897. .
12. Banyard, A. C., Wang, Z., & Parida, S. (2014). Peste des petits ruminants virus, Eastern Asia. *Emerging infectious diseases, 20* : 2176 .
13. Baron, M. D., Diop, B., Njeumi, F., Willett, B. J., & Bailey, D .(۲۰۱۷) .Future research to underpin successful peste des petits ruminants virus (PPRV) eradication. *The Journal of general virology, **98*** **:** 2635 .
14. Bazarghani, T. T., Charkhkar, S., Doroudi, J., & Bani Hassan, E. (2006). A review on peste des petits ruminants

(PPR) with special reference to PPR in Iran. Journal of Veterinary Medicine, Series B, **53:** 17-18.

15. Davari, S. A., Sayyari, M., & Mohammadi, A. (2013). Genetic analysis of the viral agents causing muzzle crust in small ruminants of Shiraz, Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 1**6:**159−169.
16. Couacy-Hymann, E., Roger, F., Hurard, C., Guillou, J., Libeau, G., & Diallo, A. (2002). Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *Journal of virological methods*, ***100*:** 17-25 .
17. Dhar, P., Sreenivasa, B., Barrett, T., Corteyn, M., Singh, R., & Bandyopadhyay, S. (2002). Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV). *Veterinary microbiology*, ***88*:** 153-159.
18. Diallo, A., Minet, C., Le Goff, C., Berhe, G., Albina, E., Libeau, G., & Barrett, T. (2007). The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine*, ***25*:** 5591-5597 .
19. Elzein, E. A., Housawi, F., Bashareek, Y., Gameel, A., Al-Afaleq, A., & Anderson, E. (2004). Severe PPR Infection in Gazelles kept under semi-free range conditions. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, ***51* :** 68-71.
20. EFSA Panel on Animal Health and Welfare. (2014). Scientific opinion on sheep and goat pox. *EFSA Journal*, **12:** 3885.
21. Esmaelizad, M., Jelokhani-Niaraki, S., & Kargar-Moakhar, R. (2011). Phylogenetic analysis of peste des petits ruminants virus (PPRV) isolated in Iran based on partial sequence data from the fusion (F) protein gene. *Turkish Journal of Biology*, ***35*:** 45-50.
22. Farougou, S., Gagara, M., & Mensah, G. A. (2013). Prevalence of peste des petits ruminants in the arid zone in the Republic of Niger. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, ***80* :** 1-6 .
23. Forsyth, M., & Barrett, T. (1995). Evaluation ofpolymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus research*, ***39* :** 127-136.
24. Gibbs, P. J., Taylor, W. P., Lawman, M. J., & Bryant, J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus. *Intervirology*, ***11*:** 268-274 .
25. Güler, L., Şevik, M., & Hasöksüz, M. (2014). Phylogenetic analysis of peste des petits ruminants virus from outbreaks in Turkey during 2008-2012. Turkish Journal of Biology, 38 : 671-678.
26. Ismail, T. M., Hassas, H. B., Nawal, M., Rakha, G. M., Abd El-Halim, M. M., & Fatebia, M. M. (1992). Studies on prevalence of rinderpest and peste des petits ruminants antibodies in camel sera in Egypt. Veterinary Medical Journal Giza, 1**0 :** 49-53.
27. Kerdiles, Y. M., Cherif, B., Marie, J. C., Tremillon, N., Blanquier, B., Libeau, G., . . . Horvat, B. (2006). Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. *Viral immunology*, ***19* :** 324-334.
28. Kerur, N., Jhala, M., & Joshi, C. (2008). Genetic characterization of Indian peste des petits ruminants virus (PPRV) by sequencing and phylogenetic analysis of fusion protein and nucleoprotein gene segments. *Research in veterinary science*, ***85*:** 176-183.
29. Kul, O., Atmaca, H. T., & Munir, M. (2015). Pathology of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants and concurrent infections

37. Munir ,M., Zohari, S., & Berg, M. (2012). *Molecular biology and pathogenesis of peste des petits ruminants virus*: Springer Science & Business Media.

38. Munir, M., Zohari, S., Saeed, A., Khan, Q., Abubakar, M., LeBlanc, N., & Berg, M. (2012). Detection and phylogenetic analysis of peste des petits ruminants virus isolated from outbreaks in Punjab, Pakistan. *Transboundary and emerging diseases, **59*** **:** 85-93 .

39. Munir, M. (2014). Role of wild small ruminants in the epidemiology of peste des petits ruminants. Transboundary and emerging diseases, **61:** 411-424.

40. Muthuchelvan, D., Sanyal, A., Sreenivasa, B., Saravanan, P., Dhar, P., Singh, R., . . . Bandyopadhyay, S. (20) . Analysis of the matrix protein gene sequence of the Asian lineage of peste-des-petits ruminants vaccine virus. *Veterinary microbiology, **113*** **:** 83-87 .

41. OIE, A. (2008). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. *Office international des epizooties, paris, France* .

42. Parida, S., Muniraju, M., Mahapatra, M., Muthuchelvan, D., Buczkowski, H., & Banyard, A. (2015). Peste des petits ruminants. *Veterinary microbiology, **181*** **:** 90-106 .

43. Rajak, K., Sreenivasa, B., Hosamani , M., Singh, R., Singh, S., Singh, R., & Bandyopadhyay, S. (2005). Experimental studies on immunosuppressive effects of peste des petits ruminants (PPR) virus in goats. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, **28*****:** 287-296 .

44. Roeder, P ,.Obi, T., Taylor, W., & Diallo, A. (1999). Recognizing peste *Peste des Petits Ruminants Virus*: Springer, Berlin, Heidelberg : 119-131.

30. Kumar, K. S., Babu, A., Sundarapandian, G., Roy, P., Thangavelu, A., Kumar, K. S., . . . Mahapatra, M. (2014). Molecular characterisation of lineage IV peste des petits ruminants virus using multi gene sequence data. *Veterinary microbiology, **174*** **:** 39-49.

31. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution, **33*****:** 1870-1874 .

32. Kwiatek, O., Minet, C., Grillet, C., Hurard, C ,.Carlsson, E., Karimov, B., . . . Libeau, G. (2007). Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. *Journal of comparative pathology, **136*** **:** 111-119 .

33. Lefever, P., & Diallo, A. (1990). Peste des petits ruminants virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz, **9*** **:** 935-981 .

34. Lembo, T., Oura, C., Parida, S., Hoare, R., Frost, L., Fyumagwa, R., . . . Cleaveland, S. (2013). Peste des petits ruminants infection among cattle and wildlife in northern Tanzania. *Emerging infectious diseases, **19*****:** 2037 .

35. Mahamat, O., Doungous, T., Kebkiba, B., Oumar, H. A., Oussiguéré, A., Yacoub, A. H., . . . Moussa, A. H. (2018). Seroprevalence, geographical distribution, and risk factors of peste des petits ruminants in the Republic of Chad. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, **5*** **:** 420 .

36. Mondal, B., Sreenivasa, B., Dhar, P., Singh, R., & Bandyopadhyay, S. (2001). Apoptosis induced by peste des petits ruminants virus in goat peripheral blood mononuclear cells. *Virus research, **73*** **:** 113-119 .

des petits ruminants: a field manual. *FAO Animal Health Manual: 5* .

45. Rowland, A., & Bourdin, P. (1970). The histological relationship between peste des petits runminants and kata in West Africa. *Revue d'elevage et de medecine veterinaire des pays tropicaux, **23*:**301-307 .

46. Rowland, A., Scott, G., & Hill, D. (1969). The pathology of an erosive stomatitis and enteritis in West African dwarf goats. *Journal of pathology, **98*:** 83-87 .

47. Sen, A., Saravanan, P., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Venkatesan, G., Sarkar, J., . . . Sudhakar, S. (2014). Detection of subclinical peste des petits ruminants virus infection in experimental cattle. *VirusDisease, **25*:** 408-411 .

48. Settypalli, T. B. K., Lamien ,C. E., Spergser, J., Lelenta, M., Wade, A., Gelaye, E., . . . Diallo, A. (2016). One-Step Multiplex RT-qPCR Assay for the Detection of Peste des petits ruminants virus, Capripoxvirus, Pasteurella multocida and Mycoplasma capricolum subspecies (ssp.) capripneumoniae. *PloS one*, *11* : e0153688 .

49. Shahriari, R., Khodakaram-Tafti, A., & Mohammadi, A. (2019). Molecular characterization of Peste des Petits ruminants virus isolated from four outbreaks occurred in southern Iran. *BMC veterinary research, **15*:** 1-6 .

50. Shaila, M., Shamaki, D., Forsyth, M. A., Diallo, A., Goatley, L., Kitching, R., & Barrett, T. (1996). Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants viruses. *Virus research, **43*:** 149-153 .

51. Singh, R., Saravanan, P., Sreenivasa, B., Singh, R., & Bandyopadhyay, S. (2004). Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants in India. *Rev Sci Tech, **23* :** 807-819 .

52. Taylor, W. (1984). The distribution and epidemiology of peste des petits ruminants. *Preventive veterinary medicine, **2*:** 157-166 .

53. Ugochukwu, I. C. I., Ugochukwu, E. I., & Chukwu, C. C. (2018). Haematological parameters and serum biochemical assay of West African dwarf goats infected with peste des petits ruminants virus in Nsukka, Enugu State. *Comparative Clinical Pathology*, ***27*:** 13-19.

54. Varshuei, H. R., Hedayati, Z., Aqa Ebrahimiyan, M., Haqiqi, S., Lotfi, M., Kamal Zadeh, M., & Abd Ol-Lahi, D. (2008). Production of PPR vaccine using attenuated strain in cell culture.

55. Wang, Z., Bao, J., Wu, X., Liu, Y., Li, L., Liu, C., . . . Zhang, W. (2009). Peste des petits ruminants virus in Tibet, China. *Emerging infectious diseases*, ***15*:** 299 .

56. Zakian, A., Nouri, M., Faramarzian, K., Sharif, M. T., & Rezaie, A. (2016). Comprehensive Review on Peste Des Petits Ruminants [PPR] Disease in Ruminants and Camels: with Emphasis on Clinical Signs and Histopathological Finding. Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis, **4**: 2.

57. Zhu, Z., Li, P., Yang, F., Cao, W., Zhang, X., Dang, W., ... & Zheng, H. (2019). Peste des petits ruminants virus nucleocapsid protein inhibits beta interferon production by interacting with IRF3 to block its activation. *Journal of Virology*, *93*: e00362-19.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 1, 2021

Phylogenetic analysis of Peste des petits ruminants virus (PPRV) according to Gene (F) and (N) in affected animals in Khorasan Razavi

Javad Ansari [1], Afshin Raoofi[*2], Omid madadgar[3], Hamid reza Varshovi[4], Saeid bokaei[5]

1. *Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran*
2. *Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran*
3. *Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran*
4. *Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj.*
5. *Full Professor ,Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran*

Received: 26 August 2019 *Accepted: 27 February2020*

Abstract

Peste des Petits Ruminants (PPR) is a highly contagious, fatal, and severe viral disease of small ruminants. The causative agent is a morbillivirus, Peste des petitsruminants virus (PPRV). This study was performed to detect and identify recently circulating PPR virus in small ruminants in the Khorasan Razavi region in Iran.

A total of 100 samples(blood, spleen and lymph node) were collected from affected and dead animals. All of the samples were positive with Reverse Transcriptase PCR for viral genome. 7 positive samples by RT-PCR were selected randomly for sequencing of the nucleoprotein (N) gene and fusion gene (F), and genetically characterized phylogenetic analysis of PPR virus strains. Four lineages of PPR virus have been identified based on sequence analysis of the nucleoprotein (N) and fusion (F) gene all around the world. In this study Phylogenetic trees were drawn up based on sequence of the N gene and gene. Both trees have two distinct clusters, and all the detected strains are in the 4th lineage and are located in the first cluster of each tree.

Keywords: PPRV, Molecular characterization, Small ruminants, Iran

**Corresponding author: Afshin Raoofi*
Address: Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
E. mail: raoofi@ut.ac.ir