

شناسایی مولکولی ویروس تب بی دوام در گاوهای استان خوزستان

خلیل میرزاده*^۱، سیده الهام رضاتوفیقی*^۲، سید صالح طباطبایی و کیلی^۱

۱- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

۲- دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۹

چکیده

ویروس تب بی دوام گاو که یک اربوویروس می باشد منجر به بیماری تب بی دوام و یا بیماری سه روزه در گاو و گاومیش می شود. بیماری ناشی از این ویروس از نظر اقتصادی دارای اهمیت زیادی است. بیماری به صورت فصلی در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل آفریقا، شرق آسیا، خاورمیانه و استرالیا شایع است. این بیماری از دهه های پیش در ایران گزارش شده است؛ با این حال مطالعه جامع در مورد سویه های شایع مناطق مختلف ایران بخصوص استان خوزستان وجود ندارد. لذا هدف از این مطالعه بررسی اپیدمیولوژی مولکولی ویروس بیماری سه روزه در جنوب غرب ایران، استان خوزستان؛ با کمک تعیین توالی ژن گلیکوپروتئین سطحی ویروس می باشد. در این مطالعه ۵۰ نمونه خون حاوی ضد انعقاد، از دام های دارای علائم بیماری تب بی دوام جمع آوری شد. پس از استخراج RNA از بافی کوت نمونه ها، حضور ژن G ویروس با کمک روش RT nested-PCR بررسی شد سپس محصولات PCR تعیین توالی شد و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد. نتایج واکنش های RT nested-PCR نشان دهنده حضور ویروس در منطقه خوزستان بود و پس از مقایسه توالی نمونه های حاضر با سایر سویه های موجود در بانک ژنی مشخص شد که جدایه های استان خوزستان در گروه مربوط به سویه های خاورمیانه قرار می گیرند و بسیار نزدیک به سویه های اسرائیل، ترکیه، هند و مصر هستند. جدایه های ویروس تب بی دوام گاوی شناسایی شده در این مطالعه از لحاظ فیلوژنی با بقیه سویه های ویروسی که قبلا در ایران شناسایی شده بودند متفاوت بود و این مطالعه نشان دهنده پدیدار شدن سویه های جدید ویروسی در خوزستان می باشد. بر اساس این یافته ها جهت شناخت بهتر اپیدمیولوژی این ویروس در کشور، مطالعات بیشتر بر پایه اپیدمیولوژی مولکولی مورد نیاز است تا بتوان راه های ورود ویروس به کشور را مشخص و برنامه های پیشگیری را تهیه و تدوین کرد.

کلمات کلیدی: ویروس تب بی دوام گاو؛ بیماری سه روزه؛ بررسی فیلوژنی؛ آر تی - نستد بی سی آر

*نویسنده مسئول: خلیل میرزاده

آدرس: گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

پست الکترونیک: mirzadeh2005@gmail.com

*نویسنده مسئول: سیده الهام رضاتوفیقی

آدرس: دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

پست الکترونیک: e.tofighi@scu.ac.ir

مقدمه

تب بی دوام گاو (Bovine ephemeral fever; BEF) که به آن بیماری سه روزه نیز گفته می شود یک بیماری ویروسی در گاو و گاومیش است که عامل آن ویروسی از خانواده رابدو ویریده (*Rhadoviridae*) و جنس *افمروویروس* (*Ephemerovirus*) است. ژنوم این ویروس RNA تک رشته ایی، تک مولکولی و با قطبیت منفی است (-ssRNA). طول اسیدنوکلئیک آن ۱۴۹۰۰ نوکلئوتید است و پنج پروتئین P، N، G، L، و M را کد می کند. گلیکو پروتئین G که در پوشینه ویروس قرار گرفته آنتی ژن اصلی حفاظتی ویروس است و دارای پنج جایگاه آنتی ژنتیکی (G1, G2, G3a, G3b و G4) در سطح خود است (۵). به دلیل توالی محافظت شده ژن G، در مطالعات مختلف از آن برای رده بندی ویروس استفاده می شود.

ویروس BEF در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آفریقا، شرق آسیا، استرالیا و خاورمیانه شایع است و در سال های اخیر در برخی استان های ایران به ویژه مناطق جنوبی و گرمسیری از جمله استان خوزستان گزارش شده است (۵). این بیماری، یک بیماری حاد غیر واگیردار است که موجب خسارات سنگین اقتصادی در مناطق درگیر می شود. شکل همه گیر بیماری با پیامدهای سنگین اقتصادی در ایران نیز گزارش شده است (۱۶).

عفونت با این ویروس ممکن است از نظر بالینی فاقد علائم باشد یا منجر به علائم بالینی خفیف تا شدید از جمله تب دو فازی، قطع نشخوار، یبوست، گرفتگی عضلانی، لنگش و بی اشتها می گردد (۱۶). معمولاً بهبودی خودبخودی پس از سه روز مشاهده می شود (۹ و ۵). نرخ ابتلا در این بیماری بالا است ولی میزان مرگ

و میر پایین است. این ویروس در طبیعت تنها از طریق نیش حشرات منتقل می شود (۲۸).

ویروس بیماری سه روزه به طور کلی در سطح دنیا یک سروتیپ دارد و تست های خنثی سازی سرمی جدایه های مناطق مختلف دنیا نشان دهنده واکنش های متقابل سرمی بین این جدایه هاست (۱۱ و ۱۹-۲۱). همچنین مشاهده شده که واکنش هایی که حتی چهل سال پیش طراحی شده اند همچنان علیه سویه های در گردش این ویروس موثر هستند. اگر چه تیتراژ خنثی سازی سویه های همولوگ بیشتر از سویه های هترولوگ است (۲۱ و ۱۰). اگر چه ویروس BEF فقط دارای یک سروتیپ هست ولی بر اساس مطالعات آنالیز فیلوژنتیکی ژن G، سویه های مناطق مختلف در سه خوشه شرق آسیا، استرالیا و خاورمیانه قرار می گیرند (۲۳، ۲۶ و ۱۵). ژن G مارکر ژنومی بسیار مناسبی است و به دلیل عدم حضور نوترکیبی ژنتیکی پیشنهاد شده که به عنوان شاخص موثری برای ارزیابی کل ژنوم ویروس در نظر گرفته شود (۲۴).

هدف از مطالعه حاضر بررسی حضور ویروس تب بی دوام گاو در منطقه جنوب غرب کشور استان خوزستان و همچنین ارزیابی شباهت آن با سایر سویه های گزارش شده در دنیا می باشد.

مواد و روش کار

جهت انجام پژوهش در تابستان ۱۳۹۷ از ۵۰ گاو دارای علائم بیماری تب بی دوام خونگیری شد. خونگیری با کمک و نوجکت در کنار ماده ضد انعقاد هپارین انجام شد. همچنین از واکنش غیرفعال تب بی دوام (*Kyotobiken Laboratories; Japan*) به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. در ادامه یک میلی لیتر از نمونه خون در میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و پس از سه دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ g مایع رویی

واکنش nested-PCR

از روش nested-PCR برای شناسایی ژن G ویروس استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول یک ذکر شده اند. جهت واکنش PCR اول واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت پنج دقیقه انجام شد. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشتی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت چهار ثانیه، اتصال در ۴۶ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه انجام شد. سپس سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ده دقیقه انجام شد. در واکنش اول طول قطعه ۱۸۷۲ نوکلئوتیدی تکثیر می شد. واکنش دوم مانند واکنش اول انجام شد با این تفاوت که زمان سنتز رشته یک دقیقه در نظر گرفته شد. واکنش با کمک مستر میکس (Ampliqon; Denmark) با غلظت ۲ میلی مولار $MgCl_2$ انجام شد. در نهایت محصول واکنش روی ژل آگارز دو درصد برده شد. در واکنش دوم طول قطعه ۴۲۰ نوکلئوتیدی تکثیر می شد. محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست (BioNeer; South Korea) ارسال شد. نمونه ها با استفاده از روش سنگر تعیین توالی شدند.

خارج شده و به رسوب حاصله یک میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و مثل حالت قبل سانتیفریوژ شد. تکرار سانتیفریوژ و شستشو تا جایی ادامه یافت که مایع رویی کاملاً شفاف شود. به این ترتیب باقی کتوت از خون جدا می شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در ادامه از باقی کتوت های حاصله با استفاده از کیت استخراج SinaPure Viral (Sinaclon; Iran) بر اساس دستورالعمل ذکر شده RNA استخراج شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت (یکتا تجهیز آزما؛ ایران) انجام شد. بدین منظور یک میکرولیتر Random hexamer primer (50 μM) با یک تا پنج میکروگرم RNA مخلوط شده و حجم واکنش با آب به ۱۳/۴ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصله در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس یک میکرولیتر (10 mM) dNTPs، چهار میکرولیتر بافر، نیم میکرولیتر (40U/ μl) RNasin و یک میکرولیتر آنزیم M-MLV اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت شصت دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس مخلوط واکنش در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

نام پرایمر	توالی	دفرنس
GF	ATGTTCAAGGTCCTCATAATTACC	۲۵
GR	AATGATCAAAGAACCTATCATCAC	۲۵
420F	AGAGCTTGGTGTGAATAC	۲۷
420R	CCAACCTACAACAGCAGATA	۲۷

ویرایش توالی و رسم درخت فیلوژنی

توالی با استفاده از نرم افزار BioEdit v7.0.4.1 مورد بررسی و ویرایش قرار گرفت. توالی سویه های مختلف این ویروس مربوط به کشورهای ایران، هند، اسرائیل، ترکیه، مصر، آفریقای جنوبی، چین، تایوان، ژاپن، و

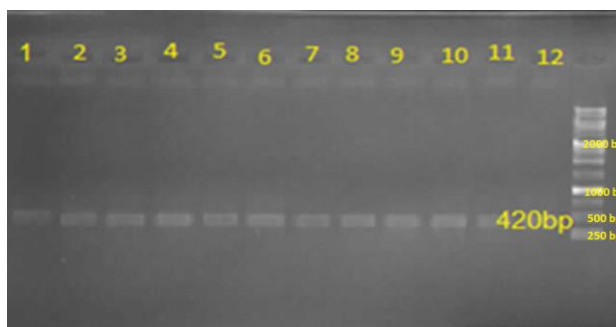
استرالیا از بانک ژنی استخراج شد. جهت رسم درخت فیلوژنی توالی های جمع آوری شده از بانک ژن با استفاده از نرم افزار (10.0.4) MegaX و همچنین Clustal W همسانه سازی (Alignment) شدند. سپس بوسیله نرم افزار MegaX درخت فیلوژنی رسم شد.

نتایج

استخراج RNA و واکنش nested-PCR

ارزیابی کیفیت RNA استخراجی بوسیله نانو دراپ مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که RNA از کیفیت مناسبی برخوردار بوده و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ برابر ۲/۰۵ بدست آمد. سپس RNA حاصله به cDNA رونوشت برداری شد. در ادامه برای بررسی وجود ژن G واکنش nested-PCR انجام شد که مشاهده بانده ۴۲۰ bp در تمام نمونه های مورد مطالعه نشان دهنده حضور ژن G و ویروس بیماری سه روزه بود (شکل ۱).

رسم درخت با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap بر اساس Maximum Likelihood و مدل General Time Reversible Model انجام شد. از Gamma Distrusted (G) برای مدل جایگزینی استفاده شد. همچنین برنامه روی Subtree-Pruning-Extensive (SPR) تنظیم شد. پس از آن درجه همسانی بین سویه ها با کمک نرم افزار Pairwise Parsimony ارزیابی شد. فاصله تکاملی سویه ها از طریق مدل جایگزینی بر اساس Maximum Composite Likelihood محاسبه شد.



تصویر ۱. واکنش nested-PCR نمونه های مشکوک به بیماری سه روزه از راست به چپ لدر (1Kb) و نمونه های شماره ۱ تا ۱۲

نتایج تعیین توالی

نتایج تعیین توالی دریافتی مورد بررسی و ویرایش قرار گرفت و سپس در بانک ژنی با کد دسترسی MT274593 ثبت شد.

آنالیز فیلوژنتیکی

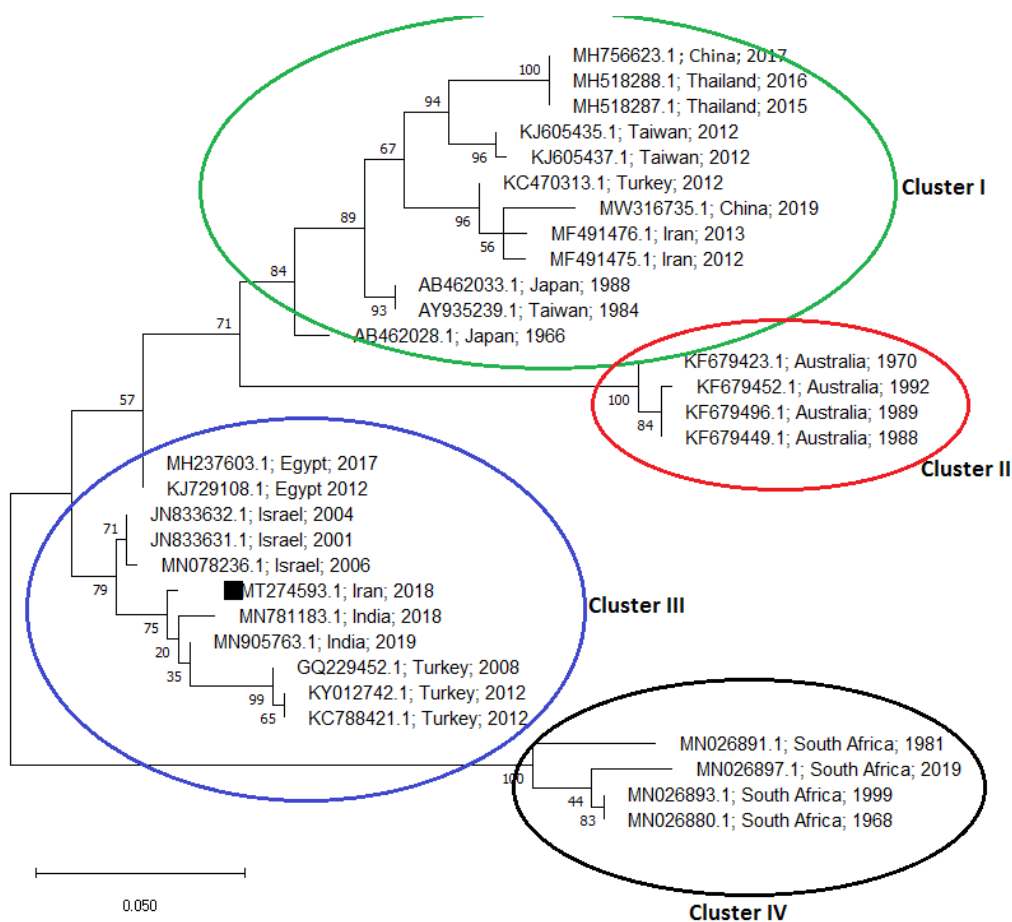
پس از همسانه سازی توالی ها با کمک نرم افزار MegaX درخت فیلوژنی رسم شد. همانگونه که در شکل دو نشان داده شده است سویه های مختلف ویروس تب بی دوام در چهار خوشه شرق آسیا، استرالیا، خاورمیانه و آفریقای جنوبی قرار می گیرند.

سویه مربوط به استان خوزستان در کنار سویه های هند و اسرائیل قرار گرفته و بیشترین شباهت را با سویه های خاورمیانه نشان داد و در خوشه مربوط به خاورمیانه قرار گرفت. از لحاظ فاصله تکاملی (جدول ۲) سویه شناسایی شده در مطالعه حاضر بیشترین فاصله را با سویه های آفریقای جنوبی نشان داد در حالی از لحاظ فاصله تکاملی بیشترین نزدیکی را به سویه های خاورمیانه داشت.

شناسایی مولکولی ویروس تب بی دوام در گاوهای استان خوزستان. ۱۱۷

جدول ۲. میزان نرخ فاصله تکاملی بین سویه های مختلف ویروس تب بی دوام

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1. MN905763.1; India; 2019																														
2. MN781183.1; India; 2018	0.011																													
3. JN833632.1; Israel; 2004	0.019	0.025																												
4. JN833631.1; Israel; 2001	0.019	0.025	0.000																											
5. MN078236.1; Israel; 2006	0.022	0.028	0.003	0.003																										
6. GQ229452.1; Turkey; 2008	0.019	0.031	0.028	0.028	0.031																									
7. KY012742.1; Turkey; 2012	0.022	0.034	0.031	0.031	0.034	0.003																								
8. KC788421.1; Turkey; 2012	0.022	0.034	0.031	0.031	0.034	0.003	0.000																							
9. MH237603.1; Egypt; 2017	0.043	0.049	0.028	0.028	0.031	0.046	0.049	0.049																						
10. KJ729108.1; Egypt; 2012	0.043	0.049	0.028	0.028	0.031	0.046	0.049	0.049	0.000																					
11. AB462028.1; Japan; 1966	0.073	0.080	0.070	0.070	0.073	0.077	0.080	0.080	0.040	0.040																				
12. KJ605435.1; Taiwan; 2012	0.083	0.090	0.080	0.080	0.083	0.086	0.089	0.089	0.061	0.061	0.054																			
13. AB462033.1; Japan; 1988	0.079	0.086	0.070	0.070	0.073	0.083	0.086	0.086	0.052	0.052	0.031	0.034																		
14. AY935239.1; Taiwan; 1984	0.079	0.086	0.070	0.070	0.073	0.083	0.086	0.086	0.052	0.052	0.031	0.034	0.000																	
15. KJ605437.1; Taiwan; 2012	0.086	0.094	0.083	0.083	0.086	0.089	0.093	0.093	0.064	0.064	0.057	0.003	0.036	0.036																
16. MH756623.1; China; 2017	0.099	0.107	0.102	0.102	0.105	0.106	0.110	0.110	0.082	0.082	0.054	0.031	0.045	0.045	0.034															
17. MH518288.1; Thailand; 2016	0.099	0.107	0.102	0.102	0.105	0.106	0.110	0.110	0.082	0.082	0.054	0.031	0.045	0.045	0.034	0.000														
18. MH518287.1; Thailand; 2015	0.099	0.107	0.102	0.102	0.105	0.106	0.110	0.110	0.082	0.082	0.054	0.031	0.045	0.045	0.034	0.000	0.000													
19. MF491476.1; Iran; 2013	0.105	0.112	0.095	0.095	0.098	0.109	0.112	0.112	0.076	0.076	0.054	0.042	0.037	0.037	0.045	0.054	0.054	0.054	0.054											
20. KC470313.1; Turkey; 2012	0.098	0.106	0.089	0.089	0.092	0.102	0.105	0.105	0.063	0.063	0.042	0.036	0.031	0.031	0.039	0.048	0.048	0.048	0.048	0.011										
21. MF491475.1; Iran; 2012	0.112	0.119	0.102	0.102	0.105	0.112	0.109	0.109	0.076	0.076	0.054	0.045	0.043	0.043	0.048	0.054	0.054	0.054	0.054	0.011	0.011									
22. KF679496.1; Australia; 1988	0.112	0.117	0.109	0.109	0.112	0.113	0.117	0.117	0.096	0.096	0.099	0.125	0.105	0.105	0.128	0.135	0.135	0.135	0.132	0.125	0.132									
23. KF679449.1; Australia; 1989	0.112	0.117	0.109	0.109	0.112	0.113	0.117	0.117	0.096	0.096	0.099	0.125	0.105	0.105	0.128	0.135	0.135	0.135	0.132	0.125	0.132	0.000								
24. MW316735.1; China; 2019	0.105	0.112	0.095	0.095	0.098	0.109	0.112	0.112	0.076	0.076	0.054	0.048	0.042	0.042	0.051	0.060	0.060	0.060	0.022	0.022	0.131	0.131								
25. KF679452.1; Australia; 1992	0.116	0.120	0.112	0.112	0.116	0.117	0.120	0.120	0.099	0.099	0.102	0.128	0.109	0.109	0.132	0.139	0.139	0.139	0.135	0.128	0.135	0.003	0.135							
26. KF679423.1; Australia; 1970	0.116	0.123	0.112	0.112	0.115	0.116	0.120	0.120	0.099	0.099	0.098	0.125	0.105	0.105	0.128	0.128	0.128	0.128	0.131	0.124	0.131	0.011	0.011	0.131	0.014					
27. MN026897.1; South Africa; 2019	0.132	0.137	0.118	0.118	0.122	0.133	0.137	0.137	0.116	0.116	0.123	0.142	0.124	0.124	0.146	0.150	0.150	0.150	0.142	0.135	0.149	0.156	0.156	0.142	0.160	0.163				
28. MN026891.1; South Africa; 1981	0.136	0.137	0.122	0.122	0.125	0.137	0.140	0.140	0.126	0.126	0.137	0.152	0.141	0.141	0.155	0.156	0.156	0.156	0.152	0.148	0.159	0.171	0.171	0.152	0.174	0.178	0.060			
29. MN026893.1; South Africa; 1999	0.139	0.144	0.125	0.125	0.128	0.140	0.144	0.144	0.123	0.123	0.134	0.142	0.131	0.131	0.146	0.150	0.150	0.150	0.152	0.145	0.159	0.157	0.157	0.152	0.160	0.164	0.022	0.042		
30. MN026880.1; South Africa; 1968	0.139	0.144	0.125	0.125	0.128	0.140	0.144	0.144	0.123	0.123	0.134	0.142	0.131	0.131	0.146	0.150	0.150	0.150	0.152	0.145	0.159	0.157	0.157	0.152	0.160	0.164	0.022	0.042	0.000	
31. MT274593.1; Iran; 2018	0.008	0.014	0.017	0.017	0.019	0.020	0.022	0.022	0.039	0.039	0.070	0.076	0.076	0.076	0.080	0.089	0.089	0.089	0.101	0.095	0.101	0.102	0.102	0.101	0.105	0.105	0.128	0.132	0.135	0.135



تصویر ۲. دندروگرام درخت فیلوژنتیکی ویروس تب بی دوام جدا شده از دام های استان خوزستان در سال ۱۳۹۷

بحث

آزمون مولکولی PCR نشان داد ویروس هایی که در مطالعه حاضر از نمونه های جمع آوری شده از دام های بیمار در استان خوزستان شناسایی شدند ویروس بیماری سه روزه می باشند و بیماری در منطقه شایع است. پس از تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنتیکی مشخص شد که این ویروس ها بیشترین شباهت را به ترتیب به سویه های ثبت شده در بانک ژن مربوط به اسرائیل (۹۹/۷٪)، هند (۹۷/۸٪) و ترکیه (۹۷٪) دارند و در خوشه خاورمیانه قرار می گیرند. با توجه به جدول دو مقایسه فاصله تکاملی این ویروس با توالی های گزارش شده از ویروس در کشورهای مختلف بیانگر قرابت نزدیک این ویروس از لحاظ تکاملی با سویه های ترکیه، هند و اسرائیل می باشد. چگونگی ورود ویروس به استان خوزستان مشخص نیست ولی به نظر می رسد این ویروس از کشورهای از جمله اسرائیل، ترکیه، هند و یا از راه جنوب و از طریق مصر و از راه عربستان وارد کشور شده باشند. این مطالعه فقط در استان خوزستان انجام شده و لذا اطلاعی از شیوع این ویروس و توالی های آنها در سال ۱۳۹۷ (۲۰۱۸) در سایر نقاط کشور در دسترس نیست، علاوه بر این در این سال رخداد بیماری در سایر نقاط کشور صرفاً به صورت موردی گزارش شده است و به صورت همه گیری نبوده است. با توجه به مشابهت ژنوم ویروس با سویه های اسرائیل، هند و ترکیه احتمالاً ویروس یا از راه مرز ترکیه وارد کشور شده باشد و یا از طریق عبور از کشورهای سوریه و عراق و از طریق اسرائیل به جنوب غرب ایران وارد شده است. گزارش هایی از رخداد و شیوع آن در کشورهای مانند عراق و سوریه وجود دارد ولی متأسفانه توالی ویروس های شایع در این مناطق مشخص نشده و در بانک ژنی در دسترس نیست.

لذا راه دقیق ورود، انتقال و گسترش این ویروس را بدون حل قطعات دیگر پازل نمی توان به طور کامل ارزیابی و مشخص کرد. وجود مشکلات متعدد و عدم مدیریت کافی در کشورهای عراق و سوریه منجر به گسترش بیماری های ویروسی دامی در این کشورها شده و نهایتاً کشور ما را نیز متأثر نموده است.

از جمله سویه های مشابه با سویه شناسایی شده سویه ۲۰۱۸ هند بود. Pyasi و همکاران (۲۰۲۰) مشخص کردند که سویه ۲۰۱۸ هند در خوشه خاورمیانه و در کنار ویروس های ترکیه و اسرائیل قرار می گیرد. با توجه به شباهت بسیار زیاد این ویروس ها به نظر می رسد که ویروس های شایع در این کشورهای ترکیه و اسرائیل با عبور از کشورهای دیگر در نهایت به کشور هند رسیده باشند. نتایجی که حاصل از مطالعه حاضر است نیز می تواند تائیدی برای این موضوع باشد. کشور ایران بین کشورهای ترکیه، اسرائیل و هند قرار گرفته و اگر ویروس بخواهد به هند برسد و یا از هند به این کشورها منتقل شود باید از کشور ایران عبور کند. در مطالعه که مربوط به کشور هند می باشد محققین معتقدند که منشا اصلی این ویروس مصر می باشد که در طی سال ها به خاورمیانه منتقل شده و از آنجا در نهایت به هند رسیده است (۱۷). با توجه به فاصله مکانی این مناطق از همدیگر به نظر می رسد که انتقال از راه حشرات انجام شده باشد. به خصوص اینکه خاورمیانه یک راه اتصال بین آسیا، اروپا و آفریقا می باشد. پژوهشگران مطالعه حاضر معتقد هستند که این ویروس از راه حشرات و جابجایی دام ها بین کشورهای هم مرز در نهایت به هند رسیده است. همچنین باد احتمالاً در این موضوع نقش مهمی داشته است. اطلاعات زیادی در مورد نقل و انتقالات دام ها بین این کشورها وجود ندارد. لذا شبیه دیگر بیماری هایی که از طریق حشرات

خوشه خاورمیانه قرار گرفتند و این امر نشان دهنده تفاوت سویه های شایع در سال های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۸ در ایران می باشند.

ممتاز و همکاران در سال ۲۰۱۱ به مطالعه ویروس بیماری سه روزه که در خوزستان شایع بود پرداختند و ویروس را شناسایی کردند البته گزارشی در خصوص توالی شایع این ویروس در سال ۲۰۱۱ در منطقه خوزستان در بانک ژن در دسترس نیست؛ با این حال مطالعه آنها نشان دهنده شیوع ویروس در منطقه خوزستان می باشد. این محققین دلیل شیوع ویروس در ایران را نقل و انتقال غیر قانونی دام از مرز از جمله از کشورهای عراق، پاکستان و افغانستان معرفی کردند. آزمایشات سری می در آن سال نشان داد که شیوع این ویروس در گاوها ۲۷٪ و در گاو میش حدود ۱۷٪ می باشد (۱۴).

در کشور ما بیماری سه روزه معمولاً دست کم گرفته شده و یا گزارش نمی شود. گرچه معمولاً مرگ و میر این بیماری در مناطق اندمیک بالا نیست اما زمانی که بیماری به منطقه پاک وارد می شود و یا هنگامی که مراقبت های لازم انجام نشود و یا ایمنی کافی وجود نداشته باشد میزان مرگ و میر به شدت افزایش می یابد. ایمنی ناشی از این ویروس معمولاً تا ۳ سال در دام پایدار می ماند و پس از آن کاسته می شود. متأسفانه در دنیا تحقیقات زیادی روی این ویروس به جز موارد محدود در کشورهایی مانند ژاپن و استرالیا انجام نشده است. به عنوان مثال مشخص نشده که دقیقاً و کتورهای این ویروس چه حشراتی هستند، مکانیسم پاتوژن این ویروس به چه صورتی است و یا اینکه در کشورهایی که فاصله زیادی از همدیگر دارند چگونه ویروس جابجا می شود. اگر چه تغییراتی در آمینو اسید های

منتقل می شوند باید شیوع این بیماری ها تحت نظارت و مراقبت و پیشگیری قرار گیرد. چون در غیر این صورت ممکن است این ویروس به صورت جهانی شیوع پیدا کند (۱۷). در عراق گزارشی از این بیماری در مناطق مختلف وجود دارد اما متأسفانه در بانک ژن گزارشی از توالی های ویروس مربوط به کشور عراق یافت نشد (۳).

در ایران اولین توالی ژنومی ویروس بیماری سه روزه توسط بخشش و عبدالهی ثبت شده است که مربوط به ویروس جدا شده از موارد بیماری در سال ۲۰۱۳ بوده است که از سه نقطه کشور شامل میاندوآب، ممسنی و شهریار جمع آوری شده بود (۴). این سویه ها بیشترین شباهت (۹۹٪) را با سویه های ۲۰۱۲ ترکیه داشتند (۴). این سویه های ترکیه در خوشه سویه های شرق آسیا قرار می گرفتند. به نظر می رسد در سال ۲۰۱۲ نوعی از ویروس مربوط به کشورهای شرق آسیا وارد خاورمیانه از جمله ترکیه و اسرائیل شده باشد و سپس از طریق مرزهای شمال غربی وارد کشور شده و مناطق مختلف کشور را درگیر نموده باشد. در خصوص منشأ اصلی این ویروس دو نظریه ذکر شده یکی اینکه ویروس احتمالاً هنگام انتقال دام از چین به اردن در سال ۲۰۰۴ وارد خاورمیانه شده است. گرچه خود دام ها در هنگام انتقال در مسافت های طولانی نمی تواند عامل منتقل کننده بیماری باشند لذا احتمالاً در هنگام انتقال دام، حشرات آلوده به ویروس نیز منتقل شده باشند. نظریه دوم اینکه منشأ ویروس خود کشور ترکیه بوده و بر اثر موتاسیون این سویه جدید که مشابه سویه های شرق آسیا بوده شکل گرفته است (۲۲). در ایران، مطالعات بخشش و عبدالهی نشان داد که سویه های ایران در خوشه شرق آسیا قرار می گیرند (۴). با این حال در مطالعه حاضر سویه های جدا شده از استان خوزستان در

منابع

- 1) Abu-Elzein EM, Al-Afaleq AI, Housawi FM, Al-Basheir AM (2006) A study of bovine ephemeral fever involving sentinel herds and seroprevalence in Saudi Arabia. *Revue scientifique et technique* **25**:1147–1151.
- 2) Abu-Elzein EM, Gameel AA, Al-Afaleq AI, Al-Gundi O, Bukhari A (1997) Bovine ephemeral fever in Saudi Arabia. *Veterinary Record* **140**:630–631.
- 3) Al-Sultany HAO, IQ Hassan IQ. (2013) Molecular investigation of bovine ephemeral fever in Iraq. *Veterinary and Animal Science* **2** : 42-50.
- 4) Bakhshesh M, Abdollahi D. (2015) Bovine Ephemeral Fever in Iran: Diagnosis, Isolation and Molecular Characterization. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* **9**: 195–203.
- 5) Beygi Nassiri MT, Pasandideh R, Seyfi Abad Shapouri MR. (2016) Cloning and Expression of the G1 Epitope of Bovine Ephemeral Fever Virus G Glycoprotein in *Escherichia coli*. *Genetics in the 3rd Millennium*. **14**: 4250-4255.
- 6) Burgess GW (1971) Bovine ephemeral fever. A review. *The Veterinary bulletin* **41**:887–895.
- 7) Davies FG, Shaw T, Ochieng P (1975) Observations on the epidemiology of ephemeral fever in Kenya. *Journal of Hygiene* **75** :231–235.
- 8) He CQ, Liu YX, Wang HM, Hou PL, He HB, Ding NZ (2016) New genetic mechanism, origin and population dynamic of bovine ephemeral fever virus. *Veterinary Microbiology* **182**:50–56
- 9) Hsieh YC, Chen SH, Chou CC, Ting LJ, Itakura C, Wang FI (2005) Bovine ephemeral fever in Taiwan (2001–2002). *Journal of Veterinary Medical Science* **67**:411–416.
- 10) Inaba Y, Sato K, Tanaka Y, Ito H, Omori T (1969) Serological identification of bovine epizootic fever virus as ephemeral fever virus. *Japanese Journal of Microbiology* **13**:388–389.
- 11) Kemp GE, Mann ED, Tomori O, Fabiyi A, O'Connor E (1973) Isolation of bovine

ویروس مشاهده شده اما تاثیر آن روی بیمار یزایی مشخص نشده است.

بیماری سه روزه به تهدید دام های خاورمیانه، استرالیا، آفریقا و آسیا کماکان ادامه می دهد. مطالعات روی حشرات ناقل این بیماری، راه های کلونیزه شدن حشرات مستعد، مطالعه بر روی خصوصیات ویروس و روند بیماری زایی آن کمک به شناسایی و یافتن راه های پیشگیری کمک خواهد کرد(۱۳).

نتیجه گیری

متأسفانه اهمیت بیماری سه روزه در کشور دست کم گرفته می شود. با توجه به نتایج حاصله چنین استنتاج می شود که بیماری در ایران خصوصا استان خوزستان وجود دارد ولی رخدادهای آنها در سال های مختلف ممکن است متفاوت باشد و این موضوع نباید منجر به دست کم گرفتن بیماری شود. سویه هایی که در سال های متفاوت شایع می شوند ممکن است متفاوت باشند و دلیل آن این است که بیماری از خارج از کشور ممکن است وارد شود. لذا جداسازی و تعیین توالی ویروس ها ضروری به نظر می رسد تا بتوان با کمک اطلاعات حاصله برنامه های پیشگیری، ساخت و انتخاب واکسن مناسب را طراحی کرد. لذا برای کنترل و پیشگیری از این بیماری بررسی های اپیدمیولوژیکی گسترده پیشنهاد می گردد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت های مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به شماره طرح پژوهشی کاربردی شماره ۲/۴۱۱/۲۰۴ انجام شده است.

- 2nd edn. Oxford University Press, Cape Town, pp 1183–1193.
- 21) Tian FG, Jiang CL, Zakrzewski H, Davis SS (1987) A comparison of a Chinese and an Australian strain of bovine ephemeral fever virus. *Australian Veterinary Journal* **64**:159.
 - 22) Tonbak S, Berber E, Yoruk MD, Azkur AK, Pestil Z, Bulut H (2013) A large-scale outbreak of bovine ephemeral fever in Turkey, 2012. *The Journal of Veterinary Medical Science* **75**:1511–1514
 - 23) Trinidad L, Blasdel KR, Joubert DA, Davis SS, Melville L, Kirkland PD, Coulibaly F, Holmes EC, Walker PJ (2014) Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian epistystem. *Journal of Virology* **88**:1525–1535.
 - 24) Walker PJ, Klement E. (2015) Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Veterinary Research* **46**:1-19
 - 25) Wang F-I, Hsu AM, Huang KJ. (2001) Bovine ephemeral fever in Taiwan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **13**: 462– 467.
 - 26) Young PL (1979) Infection of water buffalo (*Bubalus bubalis*) with bovine ephemeral fever virus. *Australian Veterinary Journal* **55**:349–350.
 - 27) Zheng FY, Lin GZ, Qiu CQ, Yuan KZ, Song JY (2007) Expression and antigenic characterization of the epitope-G1 of bovine ephemeral fever virus glycoprotein in *Pichia pastoris*. *Virologica Sinica*, **22**:347–352.
 - 28) Zheng FY, Qui CQ (2012) Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia. *Virology Journal* **9**:e268.
 - ephemeral fever virus in Nigeria. *Veterinary Record* **93**:107–108.
 - 12) Lane RP (1983) Insects of Saudi Arabia: Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) of Saudi Arabia and their veterinary importance. In: Buttiker W, Krupp F (eds) *Fauna of Saudi Arabia*, vol **5**. Ciba Geigy, Basel, pp 529–544.
 - 13) Lee f. (2019) Bovine Ephemeral Fever in Asia: Recent Status and Research Gaps. *Viruses*. **11**:1-12.
 - 14) Momtaz H, Nejat S, Moazeni M, Riahi M. (2012) Molecular epidemiology of Bovine ephemeral fever virus in cattle and buffaloes in Iran. *Revue de Médecine Vétérinaire* **163**: 415-418.
 - 15) Oguzoglu TC, Erturk A, Cizmeci SG, Koc BT, Akca Y (2015) A report on bovine ephemeral fever virus in Turkey: antigenic variations of different strains of EFV in the 1985 and 2012 outbreaks using partial glycoprotein gene sequences. *Transboundary and Emerging Disease* **62**:e66–e70.
 - 16) Pasandideh R, Beigi Nassiri MT, Seyfi Abad Shapouri MR. (2019). Expression of the G1 epitope of bovine ephemeral fever virus G glycoprotein gene by pET24-G1 recombinant construct in *Escherichia coli*. *Iranian Veterinary Journal* **15**: 15-24.
 - 17) Pyasi S, Sahu BP, Sahoo P, Dubey PK, Sahoo N, Byraredy SN, Nayak D (2020) Identification and phylogenetic characterization of bovine ephemeral fever virus (BEFV) of Middle Eastern lineage associated with 2018-2019 outbreaks in India. *Transboundary and Emerging Disease* **67**: 2226-2232.
 - 18) Rosen S (1931) Ephemeral fever (three days' fever) of cattle in Palestine. *Veterinary Journal* **87**:244–246.
 - 19) Snowdon WA (1970) Bovine ephemeral fever: the reaction of cattle to different strains of ephemeral fever virus and the antigenic comparison of two strains of virus. *Australian Veterinary Journal* **46**:258–266.
 - 20) St. George TD (2004) Bovine ephemeral fever. In: Coetzer JAW, Tustin RC (eds) *Infectious diseases of Livestock*,