DOI: 10.22055/IVJ.2019.192722.2162

تعیین هویت مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک در سال‌های ۹۵ و ۹۷ در استان قم

حسن بازیار[۱*]، محمد نوری[۲]، علیرضا قدردان‌مشهدی[۲]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۳]، حمیدرضا ورشویی[۴]، ویلیام جی‌داندون[۵] و زینب هدایتی[۴]

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکتری تخصصی بیماری‌های درونی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] استادیار مؤسسه‌ی تحقیقات و سرم و واکسن‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[۵] مشاور میکروبیولوژیست مولکولی، بخش فن‌آوری‌های هسته‌ای سازمان خواربار و کشاورزی در مواد غذایی و کشاورزی، آزمایشگاه سایبرزردورف، وین، اتریش

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۹

چکیده

طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) بیماری ویروسی بسیار واگیر، شدید و کشنده نشخوارکنندگان کوچک است. چهار دودمان (Lineage) ویروس PPR بر اساس تحلیل توالی ژن نوکلئوپروتئین (N) و فیوژن (F) شناخته شده است. هدف از این مطالعه، بررسی تعیین هویت مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک در رخدادهای PPR سال‌های ۹۵ و ۹۷ در استان قم بوده است. ۱۰ نمونه‌ی بافتی (غدد لنفاوی مزانتر) پس از کالبدگشایی از حیوانات مشکوک بالینی جمع‌آوری شد و وجود ویروس PPR با روش RT-PCR یک مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفت. بررسی توالی قطعه‌ای از ژن نوکلئوپروتئین (N) و آنالیز فیلوژنتیکی نمونه‌هایی که در RT-PCR مثبت بودند جهت تعیین دودمان جدایه‌ها انجام گرفت. از ۱۰ نمونه بالینی مورد بررسی، ۴۰ درصد آن‌ها بر اساس بررسی اسید نوکلئیک ویروس با روش RT-PCR مثبت بودند. آنالیز توالی نوکلئوتیدی و تجزیه فیلوژنتیکی جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌های به دست آمده در رده‌ی آسیایی (دودمان IV) ویروس PPR قرار دارد. نتایج فیلوژنتیک این مطالعه، حضور ویروس PPR دودمان IV را در میان دام‌های مبتلا به طاعون نشخوارکنندگان کوچک استان قم، تأیید می‌کند. بنابراین این مطالعه نشان می‌دهد که جدایه‌های PPRV ایران به دودمان چهارم مربوط می‌شوند و با جدایه‌های PRPV پاکستان، تاجیکستان و هند ارتباط نزدیک دارند. توصیه می‌شود به منظور ترسیم دقیق‌تری از وضعیت حضور و چرخش دودمان یا دودمان‌های ویروس PPR در ایران، مطالعات بیش‌تری از دیگر مناطق کشور به خصوص نواحی مرزی انجام گیرد.

کلمات کلیدی: طاعون نشخوارکنندگان کوچک، پارامیکسوویروس، هویت مولکولی، دودمان

مقدمه

طاعون نشخوارکنندگان کوچک بیماری حاد، بسیار واگیردار در گوسفند و بز است. عامل آن یک ویروس از خانواده‌ی پارامیکسوویریده، جنس موربیلی‌ویروس است (Munir et al. 2013). بسته به شدت عوامل مستعدکننده

*نویسنده مسئول: حسن بازیار، دانش‌آموخته‌ی دکتری تخصصی بیماری‌های درونی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: bazyar.h@gmail.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

و حدت ویروس، PPR را می‌توان به فرم‌های فوق حاد، حاد و تحت حاد طبقه‌بندی کرد. شایع‌ترین فرم PPR فرم حاد است که با افسردگی، تب بالا، بی‌اشتهایی، ترشحات چشم و بینی، ضایعات تخریبی دهان، پنومونی و اسهال شدید مشخص می‌شود (Megersa et al. 2011). این بیماری عمدتاً در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد، به ویژه در مناطقی که پرورش نشخوارکنندگان کوچک جزء مهمی از تولید و تجارت مواد غذایی است (De Nardi et al. 2012). با توجه به گسترش سریع این بیماری و همچنین محدودیت‌های ایجادکننده‌ی تجارت بین‌المللی دام و محصولات دامی به عنوان یک بیماری مهم اقتصادی و اخطار کردنی سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) تلقی می‌گردد (Albina et al. 2013). ژنوم ویروس PPR یک RNA منفرد خطی، تک رشته‌ای، غیر قطعه‌ای و سنس منفی است به طول ۱۵۹۴۸ نوکلئوتید است (Gibbs et al. 1979). این ژنوم شش پروتئین ساختاری را کد می‌کند: نوکلئوپروتئین (N)، فسفوپروتئین (P)، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، هماگلوتینین (H) و یک پلیمراز بزرگ (L) و دو پروتئین غیرساختاری (C و V) است. دستور ژنی ′۳–N-P(C/V)-M-F-H-L-′۵ است (Bailey et al. 2005). تنها یک سروتیپ از ویروس PPR شناسایی شده است (Shaila et al. 1996). این سروتیپ را می‌توان به چهار دودمان مجزا بر اساس آنالیز توالی ژن فیوژن (F) و یا نوکلئوپروتئین (N) متناظر با توزیع جغرافیایی ویروس طبقه‌بندی کرد (Kerur et al. 2008; Shaila et al. 1996). جدایه‌های ویروس PPR از رده‌های I و II در غرب و مرکز آفریقا گزارش شده است، رده‌ی سوم در آفریقای شرقی و بخش جنوبی خاورمیانه شایع است، در حالی که رده‌ی ۴ در آسیا رایج است (Munir et al. 2013; Munir et al. 2012b).

ویروس PPR در سراسر آسیا و خاورمیانه گسترش یافته است، البته، همانند قاره آفریقا میزان واقعی این بیماری به اندازه‌ی کافی مشخص نیست (Ashley et al. 2014). از منظر تاریخی، اولین گزارش PPRV از آسیا، در هند در اواخر دهه‌ی ۱۹۸۰ اعلام شد که این شناسایی ویروس در منطقه‌ی تامیل نادو بود (Shaila et al. 1996). این بیماری در خاورمیانه و در عربستان و امارات متحده عربی گزارش شده است (Furley et al, 1987; Taylor & Barrett, 2007). این بیماری اولین بار در سال ۲۰۰۶ توسط بازرگانی و همکاران در ایران گزارش گردید (Bazarghani et al. 2006). با این حال، در طول دهه ۱۹۹۰، ویروس در بسیاری از مناطق آسیا شناسایی شد و به نظر می‌رسد که امروزه گسترش بیماری در آسیا ادامه دارد (Ashley et al. 2014). در مناطقی که ویروس وجود دارد، غالباً تولید نشخوارکنندگان کوچک در حد بسیار زیادی کاهش می‌یابد و می‌تواند زمینه ایجاد فقر در آن نقطه از جهان را فراهم نماید. کنترل طاعون نشخوارکنندگان کوچک به عنوان یک بیماری فرا مرزی از اهمیت زیادی در توسعه پایدار دامپروری در کشورهای در حال توسعه، به ویژه در غرب آفریقا و آسیای جنوبی برخوردار است (Ashley et al. 2014). در طی سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۱ در اکثر کشورهای خاورمیانه بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک گزارش شده است (Fig 1) (Ashley et al. 2014).

با توجه به گزارش‌های متعدد بیماری در استان قم نسبت به دیگر استان‌های کشور (۲۸۳ مورد گزارش از مجموع ۱۴۳۳ مورد گزارش بیماری ثبت شده ایران بین سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۱ توسط OIE، هدف از این مطالعه، بررسی تعیین هویت مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک در رخدادهای PPR در سال‌های ۹۵ و ۹۷ در استان قم بوده است.

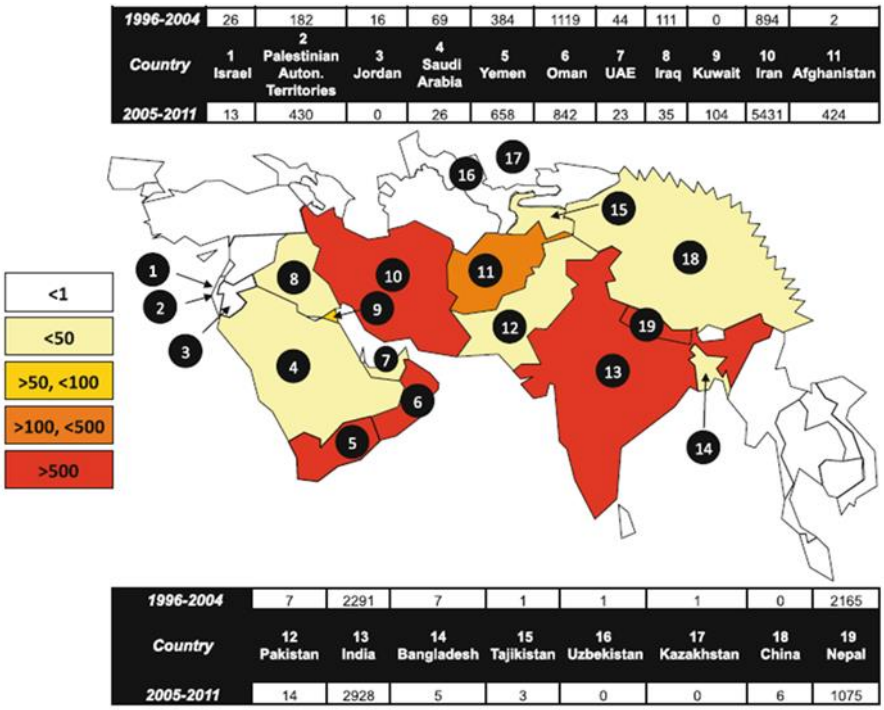

Figure 1. Map of PPR outbreaks in Asia (Munir.,2013)

مواد و روش کار

در این تحقیق با هماهنگی‌های انجام شده با دفتر بهداشت و مدیریت بیماری‌های دامی سازمان دامپزشکی کشور و استان قم و بر اساس برنامه‌ی پایش و مراقبت از بیماری‌های دامی، دو گله گوسفند و بز در دو منطقه‌ی قمرود (Qomrud) به طول ۵۱ و عرض ۳۵ جغرافیایی و میم (Meyyem) به طول ۵۰ و عرض ۳۴ جغرافیایی، آن استان به ترتیب در مهر و آبان ماه سال ۱۳۹۵ و یک گله از بزهای وارداتی نژاد سانن و نژاد آلپاین در یک واحد پرورشی در روستای زنبورک (Zanburak) به طول ۵۱ و عرض ۳۴ جغرافیایی در شهریور ماه سال ۱۳۹۷ با علائم بالینی طاعون نشخوارکنندگان کوچک شامل: آبریزش از بینی و چشم، اسهال تیره رنگ، تخریش دهانی، پنومونی، مرگ و میر در بره و بزغاله‌ها، مورد معاینه قرار گرفت. در سال ۹۵ فرآوانی ابتلا و فراوانی مرگ و میر برای این بیماری در استان قم به ترتیب ۳/۲۴ و ۱۴/۹۷ درصد و در سال ۹۷ به ترتیب ۵/۳۴ و ۱۰/۵۵ درصد بوده است. پس از اطمینان بالینی از وجود بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک و عدم سابقه‌ی واکسیناسیون علیه بیماری در این گله‌ها، پس از کالبدگشایی از بزهای تازه تلف شده، ۱۰ نمونه‌ی بافتی (غدد لنفاوی مزانتر) اخذ گردید. نمونه‌ها همان روز نمونه‌برداری در ظروف در بسته حاوی PBS استریل در کنار یخ به آزمایشگاه ویروس‌شناسی مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج ارسال گردید. تا زمان انجام آزمایش، نمونه‌ها در دمای منفی ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نمونه‌های جمع‌آوری شده (۱۰ نمونه‌ی بافتی) برای بررسی وجود RNA ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس (RT-PCR) یک مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفت. مراحل انجام آن به ترتیب زیر می‌باشد:

استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه‌های بافتی، از کیت تجاری استخراج RNA Qiagen® RNeasy Mini Kit ساخت شرکت Qiagen آلمان استفاده شد. بدین منظور هر نمونه به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل و عاری از RNAse انتقال داده شد. هر نمونه در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کیت (بافر RTL در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری

همگن شد. سپس مجدداً ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز حاوی بتامرکاپتواتانول به نمونه‌ی همگن شده اضافه و ادامه‌ی مراحل استخراج طبق دستورالعمل کیت انجام گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز رونویسی معکوس (RT-PCR) یک مرحله‌ای

آمپلیفیکاسیون قطعه‌ای از ژن N ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک بااستفاده از پرایمرهای NP3 با توالی (۵''--GTC-TCG-GAA-ATC-GCC-TCA-CAG-ACT-3) و NP4 با توالی (۵''--CCT-CCT-CCT-GGT-CCT-CCA-GAA-TCT-3) شرح داده شده در تحقیق Couacy-Hymann و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس (RT-PCR) با استفاده از کیت RT-PCR یک مرحله‌ای شرکت QIAGEN طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

انجام واکنش PCR

پس از تهیه‌ی مخلوط واکنش به شرح فوق و قرار دادن آن در یک دستگاه ترموسایکلر BioRad، مرحله‌ی رونویسی معکوس (reverse transcription step) و ساخت cDNA در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و در طی یک دور انجام شد. سپس طی یک مرحله‌ی دمایی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه مرحله‌ی غیرفعال‌سازی آنزیم RT و فعال‌سازی آنزیم پلیمراز (Inactivates RT and activates polymerase) اعمال گردید. پس از این مرحله با استفاده از ۴۰ دور تکرار برنامه‌ی دمایی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و یک دور گسترش نهایی (Final extension) در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی PCR یا آمپلیفیکاسیون cDNA انجام گرفت.

ژل الکتروفورز محصولات PCR

۱۰ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR (آمپلیکون) در یک ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE و با جریان ۱۲۰ولت/۸۰ میلی‌آمپر به مدت ۶۰ دقیقه مورد الکتروفورز قرار گرفت. ژل با محلول اتیدیوم بروماید (با غلظت ۰/۵µg در هر میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی شد و نمونه‌ها از نظر تکثیر یک قطعه باند 351 DNA جفت بازی با استفاده از یک دستگاه UV ترانس ایلومیناتور ساخت شرکت UVITEC انگلستان مورد بررسی قرار گرفتند.

محصولات نهایی PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR

(Roche High Pure PCR Product Purification) با توجه به دستورالعمل‌های شرکت تولید کننده، خالص‌سازی شد. متعاقباً آمپلیکون‌های PCR خالص‌سازی شده ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک جهت تعیین توالی و تجزیه و تحلیل نوکلئوتیدی به آزمایشگاه کشاورزی و بیوتکنولوژی متصل به سازمان خواروبار و کشاورزی سازمان ملل متحد، بخش تکنیک‌های هسته‌ای در صنایع غذایی و کشاورزی در وین اتریش و نهایتاً به آزمایشگاه LGC Genomics GmbH در برلین آلمان ارسال گردید.

بررسی توالی

تعیین توالی قطعات DNA با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی DNA Sanger dideoxy انجام شد. آمپلیکون‌ها برای تعیین توالی به LGC Genomics GmbH (برلین، آلمان) با استفاده از روش Sanger استاندارد فرستاده شدند. توالی‌های به دست آمده با استفاده از (Staden 2.0.0b8 http://staden.sourceforge.net)/ جمع‌آوری و به GenBank تحت شماره مجوز MK778375 به MK778378 اعلام شد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

توالی‌هایی از قطعه بسیار محافظت شده (highly conserved) ژن نوکلئوپروتئین N به دست آمده از جدایه‌های ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک در این مطالعه با داده‌های توالی ژن N دودمان ویروس طاعون

نشخوارکنندگان کوچک (PPRV) موجود در GenBank هم‌تراز (aligned) شدند. درختچه‌ی فیلوژنتیکی شامل توالی‌هایی است که در این مطالعه به همراه اطلاعات موجود در GenBank تهیه شده، ثبت شده است (شماره‌های ثبت شده در شکل درختچه نشان داده شده است) و آنالیز فیلوژنتیک توالی‌های تراز شده (aligned) با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML) در MEGA 6 بر اساس تحقیق Tamura و همکاران در سال ۲۰۱۳، انجام شد. از مدل ۲ پارامتر کیمورا (Kimura 2-parameter model) از جایگزینی نوکلئوتیدی با نرخ‌های یکنواخت (uniform rates) در میان سایت‌ها و ۱۰۰۰ تکرار (replications) بوت‌استرپ (bootstrap) استفاده گردید.

نتایج

یافته‌های میدانی

از مجموع ۸۵۴ رأس نشخوارکننده‌ی کوچکی که در سه منطقه میم و قمرود و همچنین گله‌ی بز نژاد سانن و آلپاین در منطقه زنبورک استان قم که با گزارش بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت، ۸۴ رأس دام علائم واضح بالینی طاعون نشخوارکنندگان کوچک را نشان دادند. در سه منطقه گزارش شده بیماری (میم و قمرود) و همچنین گله‌ی بز نژاد سانن و آلپاین، PPR با علائم بالینی بیماری شامل آبریزش از بینی و چشم، اسهال تیره، زخم‌های دهانی، دیسترس تنفسی، تب بالا و مرگ و میر مشاهده شد (Figure 2). متوسط میزان شیوع و متوسط میزان مرگ و میر بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک در سطح گله‌های مبتلا به ترتیب ۴۰/۳۶ و ۲ درصد و CFR، ۲۰ درصد گزارش گردید (Table 1).

تشخیص و تایید ویروس با استفاده از RT-PCR

از ۱۰ نمونه مورد آزمایش با RT-PCR برای بررسی اسید نوکلئیک ویروسی، ۴ نمونه (۴۰ درصد نمونه‌ها) مثبت بودند (Table 2). در الکتروفورز ژل محصولات PCR اندازه‌ی قطعه‌ی محصولات تکثیر شده ۳۵۱ bp بود. نمونه‌های مثبت از هر سه منطقه نمونه‌برداری شده بود. نتایج تشخیص و تأیید ویروس با استفاده از روش RT-PCR طبق Table 3 نشان داده شده است.

Figure 2. Clinical signs of animals naturally infected with PPRV. The oculo-nasal discharges. crust on the lips. Oral lesions with rough necrosis on the lower gum.

Table 1. Prevalence Rate, Mortality Rate, case fatality rate PPR in QOM Herd

Region	Herd population (head)	Affected (Head)	Dead (Head)	Prevalence (%) Rate	Mortality (%) Rate	case fatality rate (%)
Iran/Qom/Zanburak	24	24	9	100	37/5	37/5
Iran/Qom/Meyyem	700	40	7	5/71	1	17/5
Iran/Qom/Qomrud	130	20	1	15/38	0/76	5
Total	854	84	17	40/36	2	20

Table 2. RT-PCR results for the detection of viral PPR nucleic acid in suspected sample

Region	Sample	Animal	Number of sample	Positive cases %
Iran/Qom/Zanburak	Mesenteric lymph node	Goat	2	2(100%)
Iran/Qom/Meyyem	Mesenteric lymph node node	Goat	4	1(25%)
Iran/Qom/Qomrud	Mesenteric lymph node	Goat	4	1(25%)
Total			10	4(40%)

Table 3. Results of diagnosis and confirmation of pest des petitis virus using RT-PCR method in positive samples

Isolate	Date of Sample	Region	Breed/Animal
Isolate1	2018/09/08	Iran/Qom/Zanburak	Sannen/Goat
Isolate2	2018/09/08	Iran/Qom/Zanburak	Alpine/Goat
Isolate5	2016/11/14	Iran/Qom/Meyyem	Native/Goat
Isolate6	2016/10/02	Iran/Qom/Qomrud	Native/Goat

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

توالی نوکلئیدی ژن N آمپلیکون‌های PCR ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک ایران که ازاستان قم به دست آمد، به GenBank NCBI فرستاده شده و به ترتیب با شماره‌های ورودی

BankIt2211737 SRMV/Iran/1/2018 MK778375
BankIt2211737 SRMV/Iran/2/2018 MK778376
BankIt2211737 SRMV/Iran/5/2016 MK778377
BankIt2211737 SRMV/Iran/6/2016 MK778378

قرار داده شده است.

چهار توالی به دست آمده در این مطالعه با ۶۱ توالی از ژن N شامل ۵۸ توالی از دودمان IV و یک توالی از هر یک از دودمان‌های I تا III در مطالعه‌ی فیلوژنیک مورد بررسی قرار گرفتند. همان گونه که نتایج فیلوژنی (Figure 3) نشان می‌دهد توالی‌های مربوط به دودمان‌های مختلف به شکل کاملاً متمایز از یکدیگر در گروهای مجزا قرار گرفتند. توالی‌های مربوط به دودمان IV خود در چهار زیر مجموعه SCI تا SCIV واقع شدند. در این میان چهار توالی مربوط به این مطالعه همراه با توالی‌هایی از کشورهای نپال، هند، بنگلادش، تبت، پاکستان تاجیکستان، چین، مغولستان و امارات در زیرمجموعه‌ی SCIV طبقه‌بندی شدند اما توالی‌های دیگری از ایران (JX898849،JX898848 JX898862،JX898858،JX898861،KC152953) که در طی سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۱ تعیین و در بانک ژن قرار داده شده‌اند هیچ یک به زیرمجموعه SCIV تعلق ندارند و در ۳ زیر مجموعه دیگر قرار گرفته‌اند.

نتایج حاصل از تحلیل توالی نشان داد که تمامی جدایه‌های مطالعه‌ی حاضر از ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک از استان قم در ایران به زیرمجموعه‌ی subcluster IV، دودمان IV تعلق دارد (Figure 3).

Figure 3. Phylogenetic analysis of PPRV isolates. The tree was constructed using sequence data derived from the N gene.

بحث

بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک در بسیاری از کشورهای در حال توسعه‌ی آسیایی و آفریقایی بومی است و حتی این بیماری به کشورهای توسعه یافته از طریق گسترش عفونت جمعیت گوسفند و بز در ترکیه اروپایی نیز گسترش یافته است (Ashley et al. 2014).

بر اساس اسناد بالینی، پاتولوژیک و سرولوژیکی، مشخص است که PPR در ایران از سال ۱۹۹۵ آغاز شده است، زمانی که بیماری نوظهوری در استان ایلام مشاهده شد (Bazarghani et al. 2006). طاعون نشخوارکنندگان کوچک در ایران توسط و Abdollahpour همکاران در سال ۲۰۰۶ و Bazarghani و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز تأیید شده است و آن را تهدیدی جدی به ویژه در مناطق آسیب‌پذیر دامی کشور برای تولید نشخوارکنندگان کوچک کرده است که تأثیر منفی بر امنیت غذایی دارد. بیماری در بیش‌تر استان‌ها (۲۸ استان) طی یک دوره‌ی ۱۰ ساله (۱۹۹۵–۲۰۰۴) گزارش شد. در طی این دوره، حدود ۱۴۳۳ گله درگیر بیماری بودند که بیش‌ترین میزان آن در استان قم (۲۸۳ مورد گله) بود، در حالی که کم‌ترین میزان آن در استان سمنان (n = 3 گله) بود (Bazarghani et al. 2006). بر اساس گزارش‌های رسمی سازمان بهداشت جهانی دام (OIE) موارد متعدد رخداد بیماری در ایران صورت گرفته است به طوری که در طی ۱۶ سال اخیر، یک سوم همه‌ی گزارش‌های مربوط به PPR به OIE از ایران بوده است. از ۳۲ درصد از شیوع موارد بیماری را که از ایران در ۱۶ سال گذشته به OIE گزارش گردیده است را متعلق به سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۱ با بیش از ۵۰۰۰ رخداد بوده است (شکل ۴) (Ashley et al. 2014). اگر چه واکسیناسیون جمعیت نشخوارکنندگان کوچک در ایران تا حدودی موجب محدود کردن گسترش بیماری شده است، اما اغلب این عملیات‌ها محدود بوده‌اند. به عنوان مثال، در سال ۲۰۱۱، فقط حدود ۳/۵ میلیون نشخوارکننده‌ی کوچک از جمعیت دامی کشور که نزدیک ۸۰ میلیون رأس دام تخمین زده شده است، واکسن دریافت کردند. در طول این زمان بیش از ۲۰۰۰ شیوع PPRV در سراسر کشور گزارش شده است (Ashley et al. 2014). واضح است که یک برنامه‌ی واکسیناسیون اساسی برای محدود کردن بیماری لازم است.

PCR مطلوب‌ترین و ابزار بسیار حساس برای شناسایی ویروس و مطالعات اپیدمیولوژیک مولکولی در میان تکنیک‌های مختلف استفاده شده برای تشخیص PPRV است (Couacy-Hymann 2015). بسیاری از محققان روش RT-PCR را برای تأیید PPRV توصیه می‌کنند (Zaher and ahmed 2014).

اگر چه PPR برای مدت طولانی در ایران مورد توجه بوده است اما با بررسی پایگاه‌های علمی و اسنادی در اینترنت، مطالعات اپیدمیولوژیک مولکولی کافی در خصوص این بیماری در ایران انجام نشده است و این مطالعات کم‌تر در رابطه با تعیین هویت مولکولی (Identification) بوده است. در این تحقیق، تعیین هویت و آنالیز فیلوژنتیکی ویروس PPR در سه رخداد جداگانه بیماری در استان قم، نشان داده شده است.

آنالیز فیلوژنتیک ژن N از روش‌های کلیدی برای تمایز بین دودمان‌های در گردش ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک و کمک مهمی به اپیدمیولوژی مولکولی بیماری است (Kerue et al. 2013). مطالعات اخیر ثابت کرده‌اند که توالی ژن N به طور دقیق‌تری در مقایسه با ژن F و ژن H می‌تواند انواع دودمان ویروسی را تشخیص دهد (Kwiatek et al. 2007). مطالعات اخیر نشان داد که جدایه‌های PPRV ایران به دودمان چهارم مربوط می‌شوند و با جدایه‌های PRPV پاکستان، عربستان سعودی، تاجیکستان و چین، ارتباط نزدیکی دارند (Esmaelizad et al. 2011 and Kwiatek et al. 2007 and Munir et al. 2012b). به منظور به دست آوردن درک دقیق در مورد ماهیت ژنتیکی ویروس در حال گردش در استان قم، درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی قطعه‌ای از ژن N نشان داده شده است. در تحقیق حاضر درخت فیلوژنتیک نشان

می‌دهد که آنالیز ویروس PPR قرابت نزدیکی با دودمان-های گزارش شده از پاکستان، هند و تاجیکستان دارد. مطالعات مشابه دیگری نیز در ایران به منظور بررسی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک انجام گرفته است که نتایج آن با نتایج این تحقیق در برخی موارد مطابقت و در برخی موارد مطابقت ندارد. در بررسی آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس قطعه‌ای از ژن F که توسط Esmaelizad و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد توالی حاصل از جداسازی ویروس در ایران با ۱۶ سویه دیگر PPRV از مناطق مختلف جغرافیایی مانند هند، پاکستان، ترکیه، ساحل عاج و نیجریه قرابت دودمانی دارد که در مورد کشورهای هند و پاکستان با تحقیق حاضر مطابقت دارد. تحقیق مشابه دیگری توسط Shahriari و همکاران در سال ۲۰۱۹ در استان فارس انجام گرفته است نتایج آن با بررسی درخت فیلوژنتیک، قرابت نزدیکی با دودمان‌های گزارش شده از پاکستان، تاجیکستان و چین دارد که باستثنای چین با مطالعه‌ی حاضر مشابهت دارد. ویروس‌های در گردش در استان قم ممکن است از پاکستان باشد. قرابت ویروس در گردش با ویروس‌های پاکستان می‌تواند با توجه به ارزان بودن قیمت دام در کشور پاکستان و عدم کنترل و یا کمبود کنترل دقیق حمل و جابجایی دام در این مرز، را اثبات کند. رابطه‌ی احتمالی مشابه سویه‌های ایران با سویه‌های پاکستان از ویروس PPR می‌تواند به این دلیل باشد که ایران مرز مشترک با پاکستان و افغانستان دارد. تجارت و حمل و نقل بدون کنترل دام در سراسر مرزها همراه با جابجایی‌های فرا مرزی اطراف پاکستان، افغانستان و تاجیکستان بسیار معمول است. گروه‌بندی دودمان ویروس PPR در دو نقطه مختلف درخت فیلوژنی در این زمان نشان می دهد که جدایه‌های ویروس PPR ممکن است تحت تأثیر مسیر تکاملی قرار گرفته‌اند و یا این امر ممکن است در اثر ورود ویروس از منابع مختلف باشد. با این وجود، برای ارزیابی چنین تفسیری، نمونه‌های بیش‌تری از طیف گسترده‌ای از رخداد بیماری در مناطق مختلف مورد نیاز است.

در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از روش RT-PCR و بر اساس توالی قطعه‌ای ژن N ویروس PPR در ۴ نمونه‌ی مثبت بالینی، مشخص شد که گردش ویروس PPR در منطقه‌ی مورد مطالعه وجود دارد. البته این نتایج، دلالت دقیقی بر میزان شیوع PPRV نبست، زیرا تنها از حیواناتی که نشان‌دهنده‌ی علائم بالینی PPR بودند نمونه‌برداری شده است. توالی‌های نوکلئوتید با سایر توالی‌های PPRV موجود در Gen-Bank هم‌تراز شده‌اند و درخت فیلوژنتیک جهت تعیین دودمان ژنتیکی ویروس در حال گردش مورد استفاده قرار گرفت. دودمان IV ویروس PPR با سطوح مختلف تنوع ژنتیکی در حال حاضر در ایران در حال گردش می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر همراه با مطالعات قبلی نشان می‌دهد که الگوی پراکندگی و حرکت ویروس PPR، الگوی بازگشت گردش ویروس در سال‌های اخیر را روشن می‌کند. چنین اطلاعاتی برای درک اپیدمیولوژی مولکولی PPRV ضروری است و به منظور ایجاد روندهای کنترل مناسب برای ریشه‌کنی بیماری در زمان برنامه‌ریزی شده توسط OIE (تا سال ۲۰۳۰) ضروری است. تعیین هویت موفق ویروس و یافته‌های مولکولی این مطالعه عفونت فعال PPR را در میان جمعیت بز در استان قم را تایید کرد، که نشان دهنده‌ی خطر گسترش پراکندگی این بیماری در مناطق با شیوع بسیار پایین بیماری و یا در جمعیت حیوانات حیات وحش در کشور است. بنابراین، واکسیناسیون سیستماتیک همراه با برنامه بررسی و مراقبت جهت کنترل شیوع بیماری در مناطق درگیر بیماری، توصیه می‌شود. همچنین پیشنهاد می‌شود اکیپ‌های واکسیناسیون منظم و همچنین تشدید سیستم‌های مراقبتی با تمرکز بر تشخیص سریع و دقیق، در مناطق اپیدمیولوژیکی که نزدیک به کانون بیماری است که می‌تواند به طور بالقوه باعث افزایش گسترش بیماری شود، سازماندهی گردد. چنین ملاحظاتی باید با برنامه‌های کنترلی منطقه‌ای و ملی و همچنین برنامه‌ی ریشه‌کنی این بیماری که توسط OIE توصیه شده نیز منطبق باشد. تدابیر و قوانین سخت‌گیرانه جهت حمل و نقل دام در داخل کشور و همچنین در مناطق مرزی به خصوص در

مناطق شرقی کشور انجام گیرد. به علت اندمیک بودن بیماری در ایران، رخداد PPRV به صورت مستمر وقوع می‌یابد و اطلاعات محدودی در خصوص ماهیت ژنتیکی PPRV وجود دارد. توالی‌های توصیف شده در این تحقیق اطلاعات موجود در مورد دودمان‌های PPRV در ایران را افزایش می‌دهد. با توجه به برنامه‌ی ریشه‌کنی بیماری که توسط OIE ارائه شده است، نیازمند مطالعات اپیدمیولوژیکی بیش‌تری در آینده در دیگر استان‌های کشور و در سطح ملی است تا تصویر کاملی از ویروس در حال گردش در کشور تعیین گردد. از دیدگاه مولکولی، کمبود داده‌های ژنتیکی نشان می‌دهد که افزایش تحقیقات مولکولی برای شناسایی تغییرات ژنتیکی واقعی به دنبال شیوع و عفونت گونه‌های مختلف (حیوانات حیات وحش، شتر و . . .)، ضروری است. شناخت دقیق ویروس در حال گردش کمک مهمی جهت سیاست‌گذاری، برنامه‌ریزی و اجرای برنامه‌های کنترلی به کشورهایی همانند ایران که بیماری در آن‌ها اندمیک است، خواهد نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسنده از جناب آقای دکتر بارانی رئیس محترم اداره بهداشت و مدیریت بیماری‌های دامی استان قم به خاطر همکاری در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نماید.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب پایان‌نامه دکتری تخصصی توسط دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین گردیده است.

منابع

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. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *53*(Suppl 1): 14–16.

Albina, E., Kwiatek, O., Minet, C., Lancelot, R., de Almeida, R. S., & Libeau, G. (2013). Peste des petits ruminants, the next eradicated animal disease. *Veterinary Microbiology*, 165: 38–44.

Ashley, C., & Banyard, Satya Parida. (2014). Peste des Petits Ruminants Virus Molecular Epidemiology of Peste des Petits Ruminants *Virus Chapter*, *5* (261): 69-95.

Taylor, W. P., & Barrett, T. (2007). Rinderpest and peste des petits ruminants. *Diseases of Sheep*, *61*, 450-469.

Bailey, D., Banyard, A. C., Dash, P., Ozkul, A., & Barrett, T. (2005). Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the morbillivirus genus. *Virus Research*, 110: 119-24.

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. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *53*: 17–18.

Couacy-Hymann, E. (2015). Current Advances in Genome Detection of Peste Des Petits Ruminants Virus. Peste Des Petits Ruminants Virus. *Springer*, 155–69.

De Nardi, M., Lamin Saleh, S. M., Batten, C., Oura, C., Di Nardo, A., & Rossi, D. (2012). First evidence of Peste des Petits ruminants (PPR) virus circulation in Algeria (Sahrawi territories): outbreak investigation & virus lineage identification. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59, 214-22.

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 Jornal of Biology*, 35: 45–50.

Furley, C. W., Taylor, W. P., & Obi, T. U. (1987). An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. *Veterinary Record*, 121: 443-447.

Gibbs, E. P., 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: 268–74.

Kerur, N., Jhala, M. K. & Joshi, C. G. (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: 176–83.

Kwiatek, O., Minet, C., Grillet, C., Hurard, C., Carlsson, E., Karimov, B., et al. (2007). Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. *Journal of Comparative Pathology*, *136*(2-3): 111-119.

Megersa, B., Biffa, D., Belina, T., Debela, E., Regassa, A., Abunna, F., et al. (2011). Serological investigation of Peste des Petits ruminants (PPR) in small ruminants managed under pastoral and agro-pastoral systems in Ethiopia. *Small Ruminant Research*, 97: 134–8.

Munir, M., Zohari, S., & Berg, M. (2013). Molecular biology and pathogenesis of Peste des Petitis ruminants. Berlin: *Springer* p: 1-152.

Munir, M., Zohari, S., Saeed, A., Khan, Q. M., Abubakar, M., LeBlanc, N., & Berg, M. (2012b) Detection and phylogenetic analysis of peste des petits ruminants virus isolated from outbreaks in Punjab, *Pakistan. Transboundary and Emerging Diseases*, *59* (1): 85-93.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (Eds.). (2006). *Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences. *Saunders Ltd.* pp:730-760

Shaila, M. S., Shamaki, D., Forsyth, M. A., Diallo, A., Goatley, L., Kitching, R. P., & Barrett, T. (1996). Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. *Virus Research*, *43*(2): 149-53.

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: 177.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). Molecular Evolution Genetics Analysis version MEGA 6 *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

Zaher, K. S., & Ahmed, W. M. (2014). Isolation and identification of field isolate of Peste des Petits Ruminants Virus in Egypt. *Global Veterinaria*, 12: 667-672.

Vol. 16, No. 4, Winter, 2021 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2019.192722.2162

Molecular detection and phylogenetic analysis of Peste des petits ruminant's virus in QOM Province 2016 and 2018

Hassan Bazyar[1*], Mohammad Nouri[2], Ali Reza Ghadrdan Mashhadi[2], Masoud Reza Seyfi Abad Shapouri[3], Hamid Reza Varshovi[4], William G Dundon[5], Zeinab Hedayati[4]

[1] DVSc Graduated in Large Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Professor, Department of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Animal Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[5] Consultant Molecular Microbiologist, Joint FAO Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, IAEA Laboratories Seibersdorf, Vienna, Austria

Received: 15.07.2019 Accepted: 01.10.2019

Abstract

Peste des Petits Ruminants (PPR) is a severe, highly infectious and fatal viral disease of small ruminants. Four lineages of the PPR virus have been identified globally based on sequence analysis nucleoprotein (N) and fusion (F) gene. The aim of this study was molecular detection and phylogenetic analysis recently circulating PPR virus in small ruminants in QOM Province in Iran. A total of 10 anti-mortem samples (mesenteric lymph node) were collected from clinically suspicious animals and examined for the presence of PPRV by a one-step RT-PCR assay. Samples positive with RT-PCR were subjected to subsequently genetically characterized by sequencing of the nucleoprotein (N) gene and phylogenetic analysis of PPR virus (PPRV) strains. Of the 10 clinical samples examined, 40.0% were positive with RT PCR for viral nucleic acid. The nucleotide sequence and phylogenetic analysis indicated that these isolates were clustered genetically with Lineage IV isolates of the PPRV. phylogenetic analysis and molecular findings of this study confirmed active lineage IV PPRV infections among goat populations in QOM Province. This study and latter studies revealed that the Iranian PPRV isolates belong to lineage IV and are closely related to the Pakistan, Tajikistan and India isolates of PPRV We recommended that more studies should be done from other parts of the country, especially the border areas, to more accurately illustrate the status and circulation of the active lineage of the PPR virus in Iran.

Key words: Peste des Petits Ruminants (PPR), Paramyxovirus, Molecular detection, Lineage

[*] **Corresponding Author**: Hassan Bazyar, Resident in Large Animal Internal Medicine, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahid Chamran, Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: bazyar.h@gmail.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).