

# آنالیز فیلوژنیک و مطالعه‌ی خصوصیات توالی ژن LSD142 شش جدایه‌ی ویروس بیماری لمپی اسکین ایران و سویه‌های ثبت شده کاپری پاکس ویروس در بانک ژن

## • زینب هدایتی (نویسنده مسئول)

بخش واکسن‌های ویروسی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

## • حمیدرضا ورشوی

بخش واکسن‌های ویروسی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

## • علی محمدی

گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

## • محمد طباطبایی

گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

## • علیرضا یوسفی

بخش پاتولوژی و حیوانات تحت آزمایش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران



تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۵-۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۶-۱۲

Email: hedayaty2000@yahoo.com

## چکیده

بیماری لمپی اسکین (lumpy skin disease: LSD) یک بیماری ویروسی در گاو است که زیان‌های اقتصادی قابل توجهی به صنعت دامپروری وارد می‌کند. هدف پژوهش کنونی، بررسی خصوصیات توالی ژن LSD142، یکی از ژن‌های احتمالی موثر بر حدت، در ویروس LSD و آنالیز فیلوژنیک آن در شش جدایه‌ی ایران طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ و سویه‌های کاپری-پاکس ویروس بانک ژن بود. در این پژوهش، ژن LSD142 شش ویروس جدا شده از استان‌های کرمانشاه، آذربایجان غربی، فارس، قم، خوزستان و خراسان شمالی توالی‌یابی شد. سپس با انجام آنالیز فیلوژنیک، قرابت آن‌ها با سایر ویروس‌های جنس کاپری پاکس ویروس موجود در بانک ژن مقایسه گردید. نتایج نشان‌دهنده همولوژی صددصدی شش جدایه مورد مطالعه با یکدیگر و همچنین با دیگر سویه‌های حاد عامل LSD در دنیا بود. همچنین، نتایج آنالیز فیلوژنیک نشان داد که با استفاده از اطلاعات توالی این ژن نه تنها می‌توان هر سه ویروس آبله‌ی بزی، آبله‌ی گوسفندی و ویروس LSD را از یکدیگر تفکیک نمود، بلکه ویروس حاد و واکسینال LSD نیز از یکدیگر قابل تمییز می‌باشند. خوشه ویروس‌های آبله‌ی بزی به سه دسته‌ی مختلف از نظر جغرافیایی تقسیم شد که سویه‌های آسیای جنوب غربی و آفریقایی، سویه‌های شرق آسیا و سویه‌های شمال غربی آسیا را در بر گرفت. در خوشه ویروس‌های آبله‌ی گوسفندی، تنها ویروس آفریقایی در خوشه مجزایی نسبت به دیگر سویه‌های آبله گوسفندی قرار گرفت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژن LSD142 می‌تواند در پایش برنامه‌های ریشه‌کنی و پژوهش‌های اپیدمیولوژیک کاپری پاکس ویروس‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آنالیز فیلوژنیک، توالی نوکلئوتیدی، حدت، کاپری پاکس ویروس

- Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 75-86

### Phylogenetic analysis and investigation of LSD142 gene sequence characteristics in six Iranian isolates of Lumpy Skin disease virus and Capripoxviruses in Genbank

By: Hedayati, Z., (Corresponding Author) Animal Viral Vaccine Department, Razi vaccine and serum Research institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Varshoiee, H. R., Animal Viral Vaccine Department, Razi vaccine and serum Research institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mohammadi, A., Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. Tabatabaei, M., Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. and Yousefi, A. R., Department of Pathology and Experimental Animals, Razi vaccine and serum Research institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: hedayaty2000@yahoo.com

Received: 2020-07-29 Accepted: 2020-09-02

Lumpy skin disease (LSD) is a viral infectious disease of cattle associated with a drastic economic loss in the livestock industry. The aim of this study was to investigate sequence and phylogenetic analysis of LSD142 gene, a putative virulence gene in Capripoxviruses, in six lumpy skin disease viruses isolated in Iran during 2013 to 2014 and Capripoxvirus in the Genbank. The LSD viruses were isolated from different provinces of Iran, including Kermanshah, West-Azerbaijan, Fars, Qom, Khuzestan, and North Khorasan, and following sequencing the LSD142 gene, its homology was compared with other Capripoxvirus in the Genbank using phylogenetic analysis. The isolated LSD viruses showed a 100% identity in LSDV142 gene sequences with the virulent LSD viruses and with each other. Phylogenetic analysis revealed that not only the candidate gene has the potential to differentiate Capripoxvirus into three groups including LSD, sheep pox virus (SPV) and goat pox virus (GPV), but also the vaccinal and virulent strain of LSD virus could be divided. The GPV group was divided three geographical categories including Southwest and African strains, East Asia strains and Northwest Asia strains. In the SPV group, the African virus was separated from other strains of the SPV. These findings suggest that the LSD142 gene could be used for the genotyping and molecular epidemiology studies of the Capripoxvirus.

**Key words:** Phylogenetic analysis, Nucleotide sequence, Virulence, Capripoxvirus

#### مقدمه

بیماری لمپی اسکین (lumpy skin disease: LSD) یک بیماری ویروسی در گاو است که به علت کاهش تولید شیر، سقط، ناباروری، آسیب پوستی و کاهش کیفیت پوست، سالانه زیان‌های اقتصادی چشمگیری را به دامداران وارد می‌کند. ویروس بیماری لمپی اسکین (LSDV) همراه با ویروس آبله‌ی گوسفندی و آبله‌ی بز در خانواده پاکس‌ویریده (Poxviridae)، و جنس کاپری پاکس ویروس (*Capripoxvirus: CaPV*) قرار دارد. پس از دوره کمون ۲ تا ۴ هفته‌ای، نشانه‌های LSD با بروز تب ۴۰ تا ۴۱ درجه سانتی‌گراد نمایان می‌شود. ترشحات چشمی، آبریزش بینی، ترشح بزاق، لنگش، شمار زیاد ندول‌های پوستی، ترشحات موکوسی-چرکی بینی، انسداد مسیر تنفسی، زخم‌های دهانی، ایجاد ندول در ناحیه ملتحمه و

غلاف قضيبي، ادم کانونی و در مواردی پنومونی، عوارض بالینی شایعی است که در زمان بروز LSD مشاهده می‌شود و منجر به کاهش شدید تولید شیر، تولیدمثل و عملکرد حیوان، و همچنین القای سقط جنین می‌شود (۲۵). تشخیص اولیه LSD معمولاً براساس علائم بالینی صورت می‌گیرد.

آزمایشات میکروسکوپ الکترونی و خنثی‌سازی ویروس/سرم (virus/serum neutralization test)، هنوز به عنوان بهترین روش‌های استاندارد آزمایشگاهی برای تشخیص آنتی‌ژن و آنتی‌بادی کاپری پاکس ویروس‌ها (CaPVs) مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۵). همچنین آنتی‌ژن را می‌توان با آزمایش الایزا در نمونه‌های اخذ شده طی مراحل اولیه دوره بیماری قبل از پیدایش آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و با آزمایشات آنتی‌بادی

تغییر یافته‌ای را کد می‌کنند که در تنظیم پاسخ‌های ایمنی میزبان، بیان ژن، ترمیم DNA و اختصاصیت طیف میزبانی موثرند. ژن *LSD142* یا همان *ORF142* نیز از ساختارهای متفاوتی بین ویروس واکسینال و حاد برخوردار است. ساختار ژن *LSD142* مشابه ژن *n11* در ویروس واکسینیا (*vaccinia*) است که با تولید فاکتور ترشحی حدت، گمان می‌رود در حدت ویروس نقش داشته باشد.

اگر چه مطالعات کمی در CaPVs بر روی ژن *LSD142* صورت گرفته است، اما ساختار و خصوصیات آن در ویروس واکسینیا بیشتر بررسی شده است. این ژن یک پروتئین همودایمر ۱۴ کیلو دالتونی را بیان می‌کند که حذف آن موجب تخفیف حدت سویه مهندسی شده ویروس واکسینیا در موش می‌گردد (۶،۴). پژوهش‌های انجام شده بر روی ساختار کریستالی پروتئین حاصل از ژن *LSD142* در ویروس واکسینیا نشان می‌دهد که این پروتئین مشابه پروتئین‌های خانواده Bcl-2، ویژگی ضدآپوپتوزی دارد و از آپاپتوزیس سلول‌های عفونی جلوگیری می‌کند (۲، ۱۰). از طرفی، پروتئین حاصل از این ژن، از فعال شدن NF-kB توسط اینترلوکین-۱ در سلول‌های ترانسفکت شده جلوگیری می‌کند (۱۱) و از این راه در حدت ویروس نقش آفرینی می‌کند.

با توجه به مطالب بیان شده، پژوهش کنونی با هدف بررسی خصوصیات و توالی ژن *LSD142* ویروس بیماری LSD و آنالیز فیلوژنیک آن در جدایه‌های حاصل از مناطق مختلف در ایران جهت شناخت بهتر توالی این ژن و کاربرد آن در ارزیابی‌های پی‌آیند، انجام شد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌های ویروسی

در این تحقیق تعداد شش نمونه بافتی از نقاط مختلف کشور شامل کرمانشاه، آذربایجان غربی، فارس، قم، خوزستان و خراسان شمالی که بین سال‌های ۹۳-۹۴ به آزمایشگاه رفرانس آبله گوسفندی و بز OIE در موسسه سرم و واکسن‌سازی رازی ارسال شده و از نظر بیماری لمپی اسکین (LSD) با روش PCR-RFLP شرح داده شده توسط ورشویی و همکاران (۲۶) مثبت تشخیص داده شده بود، مورد استفاده قرار گرفت.

#### استخراج ژنوم ویروس

پس از سه نوبت انجام فرآیند انجماد-یخ‌گشایی، جهت شفاف‌سازی، نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از مایع شفاف رویی جهت استخراج ژنوم ویروس مورد استفاده قرار گرفت. استخراج ژنوم با استفاده از کیت Roche High Pure Viral Nucleic Acid (ساخت کشور آلمان) طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تکثیر ژن هدف

تکثیر قطعه کامل ژن *LSD142* با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی شامل آغازگر رفت و برگشت به ترتیب با توالی‌های:

3' - TGGTTTTGTATTTATATTCTTTTCG - 5' F: و  
3' - TGAGTTTCTTTTCGTCATGA - 5' R: انجام شد. پرایمرها بر پایه ژنوم ویروس Neethling ۲۴۹۰ به عنوان ژن رفرانس ویروس بیماری لمپی اسکین (LSDV) در بانک ژن (AF325528.1) با استفاده از نرم‌افزار

فلورسنت و PCR، شناسایی نمود. با این وجود، روش‌های اشاره شده توانایی تشخیص تفریقی LSD از سایر CaPVs را ندارند (۳). زیرا CaPVs از نظر مورفولوژی، آنتی‌ژنی و ژنتیکی شباهت زیادی با هم دارند اما به گونه‌های میزبانی متفاوتی عادت یافته‌اند (۲۴) و تنها با انجام PCR-RFLP یا تعیین سکانس ژن‌های پر کاربرد مانند CKR، RPO30، و P32 تفکیک می‌شوند (۱۴، ۱۶۱۶، ۱۷). بیشتر، توزیع جغرافیایی CaPVs متفاوت از الگوی کنونی بود، به طوری که LSD بیشتر در آفریقا حضور داشت، ولی آبله‌ی گوسفندی و آبله‌ی بز در آسیا شایع بود.

نخستین بار در سال ۱۹۲۹ LSD در شمال زیمبابوه گزارش شد و تا سال ۱۹۴۰، به دیگر کشورهای آفریقای جنوبی انتشار یافت. شیوع LSD از سال ۱۹۹۰ در منطقه خاورمیانه به طور محدود گزارش شده است و در سال ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ در فلسطین اشغالی شیوع یافت. پس از شیوع دوباره در سال ۲۰۱۲ در فلسطین اشغالی، این بیماری در عراق، ترکیه، ایران، آذربایجان، داغستان، روسیه، یونان و صربستان نیز گزارش گردید (۱۹). نخستین بار شیوع این بیماری نوپدید در ایران در سال ۱۳۹۳ توسط آزمایشگاه رفرانس آبله موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی با دو آزمایش PCR-RFLP و PCR (۲۶) تایید و به سازمان بهداشت جهانی دام OIE گزارش گردید. از آن پس، بیماری در کشور حضور دارد و با وجود برنامه‌های واکسیناسیون، موجب درگیری گله‌های صنعتی و سنتی و تحمیل ضررهای اقتصادی زیادی می‌شود. از این رو، شناخت خصوصیات مولکولی ویروس می‌تواند در بررسی‌های اپیدمیولوژی و تهیه و تولید واکسن جهت پیشگیری و برنامه‌های ریشه‌کنی و ایجاد روش‌های تشخیصی موثر باشد.

نخستین بار Tulman و همکاران (۲۰۰۱) توالی کامل ژنوم ویروس LSD را تعیین کردند (۲۳) و مشخص شد که ساختار ژنومی ویروس حاوی ۱۵۶ ژن احتمالی است و همانند سایر جنس‌های کوردوپاکس ویروس‌ها (chordopoxvirus) ۱۴۶ ژن محافظت شده دارد. این ژن‌های محافظت شده در رونوشت‌برداری، بیوسنتز mRNA، سوخت‌وساز نوکلئوتیدها، همانندسازی DNA، پردازش پروتئین‌ها، ساختمان پرویون و سرهم‌سازی ویروس، حدت ویروس و طیف میزبانی آن نقش دارند. با وجود شباهت بیش از ۹۶ درصدی کل ژنوم، در ناحیه مرکزی ژنوم به طور متوسط ۶۵ درصد شباهت اسیدآمینهای بین ویروس LSD و ژنوم دیگر ویروس‌های خانواده پاکس ویروس‌ها وجود دارد. در نواحی انتهایی ژنوم که بیشتر ژن‌های حدت ویروس و طیف میزبانی قرار دارند، کمترین شباهت (حدود ۴۳٪) بین ویروس‌های خانواده پاکس ویروس‌ها وجود دارد.

ژنوم ویروس LSD با اندازه‌ی حدود ۱۵۲ Kbp، حاوی ۷۳٪ نوکلئوتیدهای A+T در ترکیب ژنومی خود است. ژنوم این ویروس یک منطقه کدکننده مرکزی دارد که توسط دو تکرار ترمینال معکوس یکسان (ITR) با ۲۴۱۸ جفت باز در کناره‌ها محصور شده است. با مقایسه ژنوم سویه‌های حاد و واکسینال ویروس Kara، LSD و همکاران (۱۵) نشان داند که با وجود تفاوت‌های جزئی بین سویه‌های حاد این ویروس، بین ویروس واکسینال و حاد در ۷۳ درصد از ژن‌ها تفاوت وجود داشت و ۴۳۸ جانشینی اسید آمینه در ۱۱۴ ژن مشاهده شد. گفتنی است که این تفاوت‌ها بیشتر در نواحی انتهایی ژنوم وجود داشته و فرم شیف‌هایی (frameshift) را شامل می‌شد که ORF‌های کوتاه شده را ایجاد می‌کند. این ORF‌ها، پروتئین‌های

شده از نمونه‌های مورد مطالعه پیش‌بینی شد. مقایسه توالی اسید آمینه ژن LSD142 در کاپری پاکس و ویروس‌ها ثبت شده در بانک ژن و شش جدایه ایران به روش MAS توسط برنامه ClustalW مربوط به نرم‌افزار BioEdit (Version 7.0.9.0) انجام گرفت.

### نتایج

#### تکثیر ژن، بررسی توالی نمونه‌ها و قرابت ژنتیکی با توالی‌های ثبت شده

آشکارسازی باندهای تکثیر شده در واکنش PCR طی فرآیندهای الکتروفورز در شکل ۱ نشان داده شده است. آنگونه که مشخص است، واکنش PCR، منجر به تکثیر باندهایی با طول ۵۲۷ bp (شامل طول کامل ژن [۴۰۵] و توالی بالادست [۶۸ bp] و پایین دست [۵۴ bp])، پس از تعیین توالی و مقایسه توالی‌های به دست آمده با ویروس بیماری لمپی‌اسکین مرجع (Neethling ۲۴۹۰) در بانک ژن، طول کامل ژن (۴۰۵ bp) برای هر جدایه تعیین شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی در نمونه‌های مورد مطالعه با ویروس‌های آبله گوسفندی (Sheeppox virus: SPV)، آبله بز (Goatpox virus: GPV) و لمپی‌اسکین (LSDV) ثبت شده در بانک ژن (جدول ۱) نشان داد که الگوی نوکلئوتیدی ژن LSD۱۴۲ در شش جدایه ایران و سویه‌های حاد ویروس LSD کاملاً شبیه به هم بود و نسبت به سویه‌های واکسینال ویروس بیماری لمپی‌اسکین پنج تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شد (شکل ۲). همچنین دو حذف سه نوکلئوتیدی در سویه‌های واکسینال ویروس بیماری لمپی‌اسکین نسبت به توالی‌های مورد مطالعه و توالی سویه‌های حاد ویروس بیماری لمپی‌اسکین مشاهده شد. سویه‌های حاد ویروس بیماری لمپی‌اسکین در مقایسه با SPV و GPV به ترتیب حداقل ۱۸ و ۱۲ نقطه متغییر و یک حذف سه نوکلئوتیدی داشتند (شکل ۲).

قرابت ژنتیکی ژن LSD142 در نمونه‌های LSDV ایران با سوش‌های حاد و واکسینال LSDV به ترتیب ۱۰۰ و ۹۷ درصد بود، در حالی که با SPV حدود ۹۵ و با GPV حدود ۹۶ درصد قرابت داشت. سویه‌های SPV با GPV در ژن LSD142 به میزان ۹۳ درصد قرابت ژنتیکی داشت.

### آنالیز فیلوژنی

ارزیابی درخت فیلوژنتیک (شکل ۳) نشان داد که بر اساس تفاوت میزبانی، ویروس‌های مختلف مورد مطالعه در سه خوشه ژنتیکی نزدیک به هم، شامل خوشه‌های GPV، SPV و LSDV قرار گرفتند. همچنین، خوشه LSDV به دو زیر خوشه ویروس‌های واکسینال و حاد تقسیم شد. خوشه GPV بر حسب منطقه جغرافیایی، در سه دسته شامل سویه‌های آسیای جنوب غربی و آفریقایی، سویه‌های شرق آسیا و سویه‌های شمال غربی آسیا قرار گرفتند. در خوشه SPV، ویروس آبله گوسفندی نیجریه از بقیه سویه‌های آبله گوسفندی در آسیا مجزا بود.

در زیر خوشه اول LSDV، تمامی سویه‌های حادی قرار داشت که عامل واگیری‌های مختلف در مناطق درگیر با LSD می‌باشند. در زیر خوشه دوم، سویه‌های واکسینال رایج LSD به همراه دو سویه LSD Cro2016 و واگیری‌های مختلف در مناطق درگیر با LSD می‌باشند. در زیر خوشه سوم، سویه‌های سودان، عمان و یمن؛ زیر خوشه دوم که تنها سویه‌های آسیایی

Oligo7 طراحی شد. برای تکثیر همه‌ی طول قطعه نوکلئوتیدی مد نظر، پرایمرها به گونه‌ای طراحی شد که پرایمر مستقیم از ۶۸ نوکلئوتید بالا دست شروع ژن و پرایمر برگشت ۵۴ نوکلئوتید پایین دست نقطه پایان ژن را تکثیر نماید. طول قطعه تکثیری بر اساس این پرایمرها ۵۲۷ bp پیش‌بینی شد که ژن LSD142 با اندازه‌ی ۴۰۵ bp را به طور کامل در بر می‌گرفت. واکنش PCR در سه تکرار و با حجم ۵۰ میکرولیتر با آنزیم Takara (PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase) و طبق دستورالعمل آن انجام شد. هر مخلوط واکنش شامل: ۱۰ μl از بافر ۵x، ۲ μl از مخلوط بازهای نوکلئوتیدی ۱۱ μl، (dNTPs) از هر یک از پرایمرها (۱۰ pM) و ۰.۵ آنزیم (۲.۵ U) بود. از نمونه بافتی گاوهای سالم جهت کنترل منفی استفاده شد. واکنش PCR شامل یک چرخه مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل: واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴۰ ثانیه بود. در ادامه با انجام یک سیکل تکثیر پایانی در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه، واکنش به پایان رسید. تایید تکثیر قطعات با انجام الکتروفورز به مدت ۶۰ دقیقه روی ژل آگارز (۱/۵ (W/V) در بافر TAE ۱X و رنگ‌آمیزی ژل و مشاهده در دستگاه ژل داگ انجام شد. (شکل ۱) به منظور توالی‌یابی قطعات تکثیر شده، محصول PCR با استفاده از کیت Roche High Pure PCR Product Purification Kit تخلیص شد و با روش سنگر به صورت خوانش دو طرفه، توالی‌یابی شد (شرکت Bioneer کره جنوبی). توالی نمونه‌ها بعد از تعیین توالی با شماره دسترسی MN817773 تا MN817775 به ترتیب برای فارس، کرمانشاه و آذربایجان غربی و شماره‌های MT015601 تا MT015603 به ترتیب برای خوزستان، قم و خراسان در در بانک ژن ثبت شد.

### آنالیز فیلوژنیک و تعیین درصد قرابت ژنتیکی

دو خوانش هر توالی ژن LSD142 مربوط به شش جدایه ایران توسط نرم‌افزار DNAMAN سرهم‌سازی (Assembly) شد. سپس توالی هر جدایه با توالی این ژن در ویروس مرجع LSD در بانک ژن (Neethling 2490) هم‌مدیف‌سازی شد و با تعیین محدوده آغاز و پایان ژن، توالی کامل ژن معین گردید. سپس با بلاست کردن توالی ژن LSD142 بدست آمده در پایگاه اینترنتی NCBI، توالی ژن LSD142 کاپری پاکس ویروس‌های ثبت شده در بانک ژن جهت استفاده در مطالعه انتخاب شد. مقایسه قرابت ژنوتیپی به روش هم‌مدیفی چندگانه (Multiple sequence alignment=MSA) توسط برنامه ClustalW نرم‌افزار BioEdit (Version 7.0.9.0) انجام گرفت. همچنین، آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از برنامه الگوریتم اتصال همسایه (neighbor-joining) نرم‌افزار MEGA7 بر روی توالی‌های نوکلئوتیدی با تکرارپذیری (bootstrap) ۱۰۰۰ صورت پذیرفت و درخت فیلوژنتیک ترسیم گردید.

### بررسی توالی اسید آمینه‌ی ژن LSD142

در این مطالعه، توالی اسید آمینه‌ای بر اساس توالی نوکلئوتیدی حاصل

جدول ۱- مشخصات ویروس‌های انتخابی از بانک ژن به منظور ارزیابی قرابت ژنتیکی جدایه‌های LSD ایران با سایر ویروس‌های جنس کاپری‌پاکس ویروس و ترسیم درخت فیلوژنتیک

شماره دسترسی در بانک ژن	سال	کشور	نام سویه ویروس
AF325528.1	۱۹۵۸	کنیا	LSD Neethling 2490
KX683219.1	۱۹۷۴	کنیا	۰۲۴۰ KSGP
AF409137.1	۱۹۹۹	آفریقای جنوبی	Neethling Warmbaths LW
KX894508.1	۲۰۱۲	فلسطین اشغالی	LSD 155920/2012
MN995838.1	۲۰۱۴	ترکیه	LSD pendik
MH893760.2	۲۰۱۵	روسیه	LSDV/Russia/Dagestan
KY829023.3	۲۰۱۵	یونان	LSD Evros/GR/15
MN642592.1	۲۰۱۶	قزاقستان	LSD Kubash/KAZ/16
KY702007.1	۲۰۱۶	صربستان	LDS Serbia/Bujanovac
MN072619.1	*۲۰۱۹	کنیا	LSD Kenya
AF409138.1	۱۹۵۹	فریقای جنوبی	Neethling vaccine LW
KX764643.1	۱۹۹۹	فریقای جنوبی	SIS-Lumpyvax vaccine
MK441838.1	۲۰۱۱	فریقای جنوبی	Herbivac LS batch 008 vaccine
KX764645.1	۲۰۱۶	فریقای جنوبی	Neethling-LSD vaccine-OBP
KX764644.1	۲۰۱۶	فریقای جنوبی	Neethling-Herbivac vaccine
MG972412.1	۲۰۱۶	کرواسی	LSD Cro2016
MH646674.1	۲۰۱۷	روسیه	LSDV/Russia/Saratov
KX576657.1	۱۹۶۵	ایران	GPV / Gorgan vaccine
AY077836.1	۲۰۰۰	قزاقستان	GPV G20-LK vaccine
AY077835.1	۲۰۰۰	قزاقستان	GPV Pellor
MN072624.1	*۲۰۱۹	سودان	GPV Sudan
MN072623.1	*۲۰۱۹	عمان	GPV Oman
MN072625.1	*۲۰۱۹	یمن	GPV Yemen
MN072622.1	*۲۰۱۹	ترکیه	GPV Turkey
MN072621.1	*۲۰۱۹	ویتنام	GPV Vietnam
MN072620.1	*۲۰۱۹	هند	GPV India
KC951854.1	۲۰۱۲	چین	GPV FZ
MH381810.1	۲۰۱۸	چین	GPV AV41

سایر سویه‌های این خوشه تفاوت ایجاد کرده بود.

### بحث

پژوهش حاضر بر روی ژن LSD142 شش جدایه ایران از مناطق مختلف کشور انجام شد که مناطق احتمالی ورود بیماری و یا نخستین محل‌های گزارش بیماری بود که بیشترین گزارش بروز بیماری وجود داشت. با توجه به مطالعات صورت گرفته بر روی ژن LSDV142 در ویروس واکسینا و شباهت ساختاری پروتئینی آن با این ژن در LSDV، که یک ژن حدت محسوب می‌شود، این مطالعه با هدف دستیابی به اطلاعات مولکولی ساختار این ژن، برای پیشبرد اهداف کنترل بیماری، تولید واکسن و کاربرد در برنامه‌های پایش و ریشه‌کنی و بررسی‌های اپیدمیولوژی انجام شد. بیماری لمپی‌اسکین یک بیماری ویروسی حاد تا مزمین در گاو است که با بروز ضایعات پوستی شناخته می‌شود. ویروس عامل بیماری در خانواده پاکس-ویریده و جنس کاپری‌پاکس ویروس (Capripoxvirus: CaPV) قرار دارد و با سایر کاپری‌پاکس ویروس‌ها (CaPVs) ارتباط آنتی‌ژنیک و قرابت ژنتیکی بالایی دارد. علی‌رغم این شباهت‌ها، CaPVs می‌توانند بر حسب منشاء میزبانی به سه خوشه GPV، SPV و LSDV تقسیم شوند (۸، ۹). در سال ۲۰۰۲، Tulman و همکاران نیز با مقایسه توالی‌های کامل ژنوم CaPVs نشان دادند که با وجود شباهت ژنتیکی بالا، CaPVs به‌طور مشخصی از هم مجزا می‌باشند و در سه خوشه سه خوشه GPV، SPV و LSDV قرار می‌گیرند (۲۴).

نتایج پژوهش حاضر بر روی ژن LSD142 شش جدایه ایران نشان از همولوژی ۱۰۰ درصدی آن‌ها با یکدیگر و با سویه‌های حاد رایج عامل LSD در دنیا داشت. با وجود شباهت ۹۷ درصدی، جدایه‌های LSDV ایران از ویروس‌های واکسینال LSD به‌طور مشخصی متمایز بودند.

را شامل می‌شد خود شامل دو دسته‌ی ۱) سویه‌های ترکیه، گرگان، G20-LK و Pellor (1 و 2) سویه‌های ویتنام، هند و چین (FZ و AV41) بود که نهایت سه دسته جغرافیایی را نشان می‌داد (شکل ۳).

### بررسی توالی اسید آمینه‌ی ژن LSD142

در بررسی مقایسه‌ای توالی اسید آمینه ژن LSD142 بر اساس موتاسیون‌های تک اسید آمینه‌ای و موتاسیون اضافه/حذف، مشخص شد که سه خوشه GPV، SPV و LSDV قابل تمایز می‌باشد (شکل ۴) و الگوی توالی اسید آمینه منحصر به فرد هر خوشه به صورت [N11, S23, K32, I43, K50 and S96]:GPV ، SPV: [E8, R11, S31, Y46, K90, K126 and I127] ، LSDV [H11, gap in 25 and E108] بود.

در زیر خوشه‌های LSD، ویروس حاد و واکسینال با دو حذف اسید آمینه‌ای در اسید آمینه‌های ۵ و ۳۷ و جانشینی در جایگاه ۲۵ و ۱۱۰، متفاوت بود. بیشترین جهش تک اسید آمینه‌ای در زیر خوشه‌های GPV و در جایگاه‌های نوکلئوتیدی ۲۹، ۳۸، ۸۰، ۹۲، ۱۰۵ و ۱۳۲ مشاهده شد. قابل توجه است که پنج جانشینی اول مربوط به سویه‌های سودان، یمن و عمان بود و سویه‌های واکسینال گرگان و G20-LK قزاقستان و سویه‌های حاد ترکیه و Pellor با تنها یک جانشینی در جایگاه ۱۳۲ از سویه‌های چین، هند و ویتنام مجزا بود. با وجود جانشینی اسید نوکلئیک تک، در برخی سویه‌های SPV، بیشترین شباهت بین خوشه‌ی از نظر توالی اسید آمینه در خوشه SPV وجود داشت، زیرا بیشتر جانشینی‌های تک نوکلئوتیدی منجر به تغییر کد اسید آمینه نشده بود. تنها یک جانشینی تک اسید آمینه‌ای در جایگاه ۲۸ توالی اسید آمینه‌ای بین سویه نیجریه و با

ادامه جدول ۱-

شماره دسترسی در بانک ژن	سال	کشور	نام سویه ویروس
MN072626.1	*۲۰۱۹	عراق	SPV Abu Gharib
MN072630.1	*۲۰۱۹	عربستان	SPV Saudi Arabia
MN072627.1	*۲۰۱۹	عربستان	SPV/ Saudi Arabia vaccine
MN072629.1	*۲۰۱۹	ترکیه	SPV Pendik
MN072628.1	*۲۰۱۹	نیجریه	SPV Nigeria
AY077832.1	۱۹۷۰	ترکیه	SPV TU-V02127
AY077833.1	۱۹۸۷	قزاقستان	SPV A
AY077834.1	۱۹۹۴	قزاقستان	SPV NISKHI
MN072631.1	*۲۰۱۹	ترکیه	SPV/Turkey vaccine

\* سال ثبت در بانک ژن، سال‌های ذکر شده در بقیه موارد مربوط به سال جمع‌آوری نمونه است.

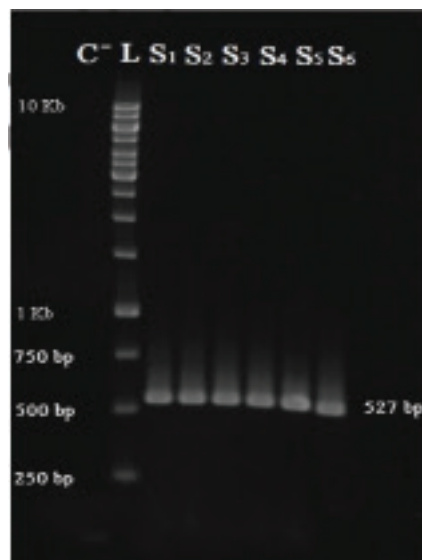
یک ویروس پیش‌بینی کرده‌اند که این ژن در حدت ویروس نقش داشته و تغییرات آن منجر به تخفیف حدت ویروس شده است (۷)، اما وجود اختلاف در ژن LSD142 در سویه‌های حاد و واکسینال ویروس بیماری لمپی‌اسکین نمی‌تواند به تنهایی مؤید تاثیر آن بر تخفیف حدت سویه‌های واکسینال باشد زیرا این اختلاف در ژن‌های بسیاری از آنها دیده می‌شود و مواردی از بیماری‌زایی برخی سویه‌های مشابه توالی سویه‌های واکسینال گزارش شده است (۲۲). بر این اساس، از آنجا که سویه حاد و واکسینال LSDV متعلق به پروتوتیپ‌های مجزای ویروس هستند و در ژن‌های زیادی با هم تفاوت دارند و در دیگر خوشه‌های CaPVs تفاوتی در ویروس واکسینال و حاد در این ژن وجود نداشت، تنها مطالعات ژنومی نمی‌تواند تاثیر این ژن را در حدت CaPVs تایید و یا رد کند.

مقایسه ژنوم کامل سویه حاد و سویه واکسینال آفریقای جنوبی نشان از اختلاف اسیدآمینه‌ای در ۱۱۴ ژن از مجموع ۱۵۶ ژن LSDV داشت (۱۵). در پژوهشی دیگر، Le Goff و همکاران با بررسی تنوع ژنی CaPVs با استفاده از ژن GPCR نشان دادند که سویه حاد RSA/54 Haden/1954 در زیر خوشه سویه‌های واکسینال LSDV قرار دارد و مدعی شدند که احتمالاً منشأ این سویه‌ها است (۱۷). از طرفی، در مطالعه Lamien و همکاران با تعیین توالی ژن RPO30 سویه حاد RSA/54 Haden/1954، مشخص شد در این ژن نیز این سویه با سویه‌های واکسینال مشابهت کامل دارد و نتایج مطالعه Le Goff و همکاران را تایید کرد (۱۶). با توجه به این یافته‌ها، شاید بتوان گفت قرار گرفتن سویه‌های واکسینال LSDV در زیر خوشه مجزا از سویه‌های حاد، ناشی از تغییرات حاصل از تخفیف حدت در ویروس نیست، بلکه LSDV از دو سویه اصلی منشأ گرفته‌اند و منشأ سویه‌های واکسینال از منشأ سایر ویروس‌های حاد رایج متفاوت می‌باشد. بدین ترتیب، دو پروتوتیپ اصلی LSDV شامل RSA/54 Ha-1954 den و ویروس‌های مربوط به آن و دیگری Neethling 1958/2490 و ویروس‌های حاد رایج وجود دارد. براساس داده‌های این پژوهش پروتوتیپ اول حدت کمتری دارد و همه سویه‌های واکسینال موجود از آن نشأت گرفته‌اند، اما بدان معنی نیست که همه سویه‌های این پروتوتیپ غیربیماری‌زا هستند؛ چنانچه سویه‌های Cro2016/Croatia و Russia/Saratov/2017 مربوط به پروتوتیپ اصلی RSA/54 Haden/1954، از ضایعات پوستی در دام‌های مشکوک به LSD جدا شده‌اند (۵، ۲۲). پروتوتیپ Neethling 2490/1958 از حدت بیشتری برخوردار بوده و به کرات از موارد LSD جدا شده است و با گذشت زمان تغییرات اندک در آن دیده شده است. در برخی مطالعات فیلوژنتیک، بر اساس تنوع اندک ژنتیکی سویه‌های زیر خوشه حاد، به دسته‌هایی مجزا تقسیم می‌شود.

پژوهش‌های فیلوژنتیک انجام شده بر روی ژن LSDV126 نشان می‌دهد که تغییرات کوچک، به آرامی ویروس‌های حاد LSD آفریقای را از آن‌هایی که در خاور میانه و اروپا در گردش هستند، جدا کرده و سویه‌های حاد را می‌توان به نمونه‌های اروپایی/آسیایی و نمونه‌های آفریقای تقسیم کرد (۱۲). بررسی توالی ژن‌های GPCR و RPO30 ویروس LSD در ایتالیایی بین سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۲ در مناطق مختلف تنوع ژنتیکی را هرچند کم نشان داده است (۱۳). همچنین، جدایه‌های LSDV در کشورهای اوگاندا و ترکیه برحسب توالی ژن (۲۰، GPCR) و عراق در ژن P32 دارای تنوع ژنتیکی بودند (۱۸). با این حال، همراستا

درخت فیلوژنتیک حاصل، مشابه مطالعات پیشین (۱۷) CaPVs را به سه خوشه مشخص تقسیم کرده و در خوشه LSDV شامل دو زیرخوشه حاد و واکسینال بود و همه جدایه‌های ایران در زیرخوشه حاد قرار گرفتند. پژوهش‌های فیلوژنتیک سالیان اخیر بر روی توالی ژن‌های GPCR، LSDV126، RPO30 و P32 و نیز مطالعه‌ی ژنوم کامل CaPVها نشان از احتمال وجود زیر خوشه‌هایی در خوشه‌های اصلی این ویروس‌ها دارد (۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۷، ۲۶). برای نمونه، همراستا با نتایج پژوهش کنونی، بررسی تنوع ژنی این ویروس‌ها با استفاده از ژن GPCR برای خوشه‌های LSDV و GPV زیر خوشه‌های کاملاً مجزا تعریف شد (۱۷). در تمامی این تحقیقات به‌طور شاخص خوشه LSDV به دو زیر خوشه اصلی تقسیم گردید که یکی شامل سویه‌های واکسینال و دیگری متشکل از سویه‌های حاد بود (۱، ۱۲، ۱۳، ۱۷، ۲۱، ۲۲).

شایان توجه است که اختلاف ژن LSD142 بین سویه‌های واکسینال و حاد ویروس تنها در خوشه LSDV دیده شد در حالی که از نظر توالی ژن LSD142 در خوشه‌های ویروس آبله‌ی گوسفندی و بز، بین سویه‌های واکسینال و سویه حاد اختلاف شاخصی وجود نداشت. اگر چه پژوهش‌های انجام یافته بر روی ژنوم ویروس واکسینا، این ژن را در حدت ویروس موثر نشان می‌دهد و با مطالعه ژنومی در توالی ژن‌های ankyrin like و kelch protein\_ کاپری‌پاکس ویروس‌ها، وجود جهش‌ها در این دو ژن را در تخفیف حدت سویه‌های واکسینال موثر دانسته‌اند (۷) و با آنکه برخی محققین با نشان دادن اختلاف یک ژن در سویه‌های حاد و واکسینال

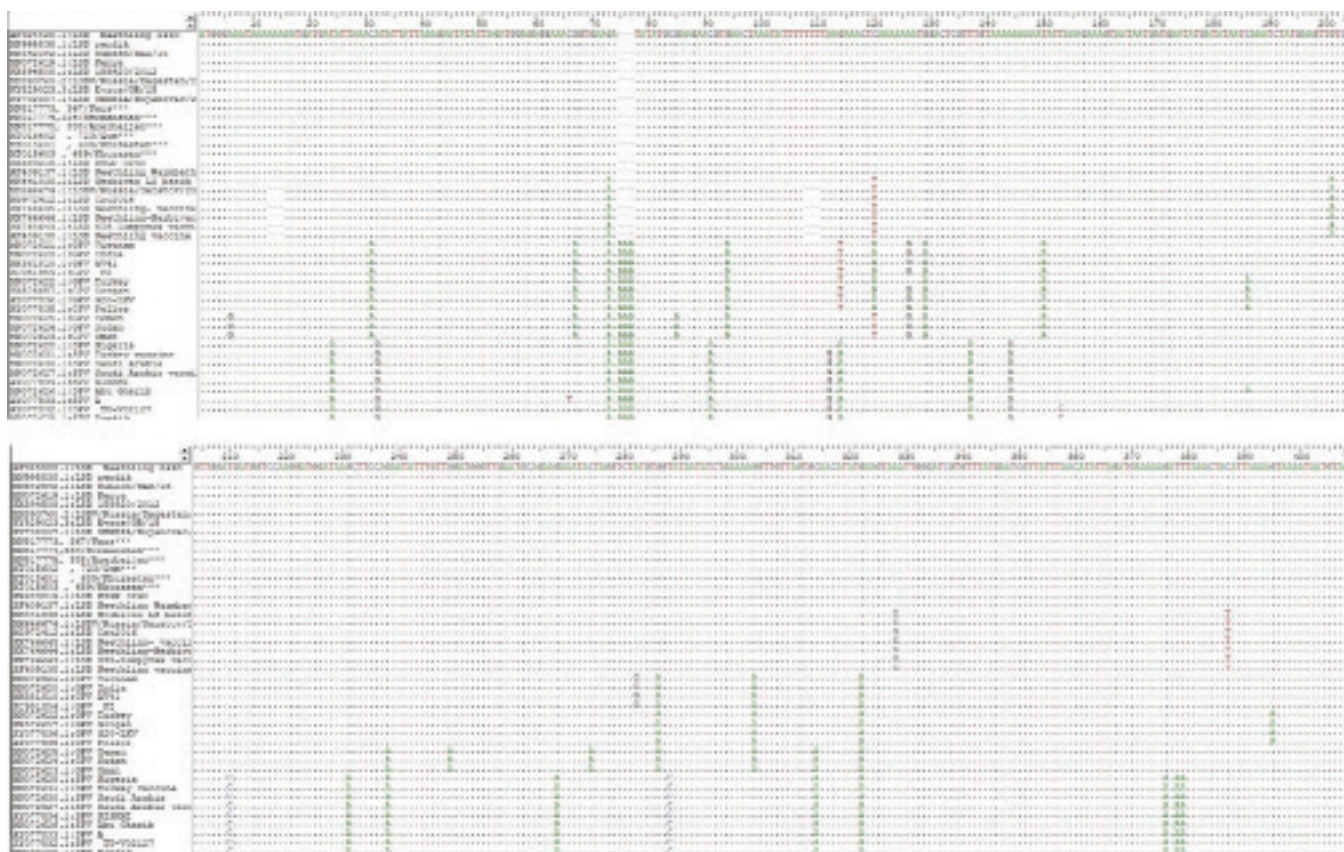


شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن LSD142 ویروس بیماری لمپی‌اسکین (LSDV) جداسازی شده از گاوهای مبتلا به این بیماری در استان‌های مختلف کشور. L = نشانگر وزن مولکولی ۱۰ Kb؛ C- = کنترل منفی؛ S1 تا S6 = نمونه‌های مربوط به جدایه‌های ویروسی

در دسته‌بندی خوشه GPV مشاهده شد که شامل ۱- سویه‌های آسیای جنوب‌غربی و آفریقایی، ۲- سویه‌های شرق آسیا و ۳- سویه‌های شمال غربی آسیا بود. این الگو از مجاورت جغرافیایی هر دسته با کشورهای نشأت می‌گیرد که در آن بیماری انتشار داشته است. در خوشه SPV، به علت وجود تنوع نقطه‌ای بین سویه‌های مختلف که از یک روند یکسان برخوردار نبود، تنها سویه نیجریه به طور شاخص از سایر سویه‌ها مجزا شد. در این خوشه نیز تفاوت شاخص بین سویه‌های واکسن و سویه حاد وجود نداشت. این یافته‌ها با نتایج بدست آمده در پژوهش‌های پیشین بر اساس ژن GPCR مطابقت داشت (۱۷)؛ جایی که در خوشه GPV دو زیر خوشه اصلی وجود داشت که یک زیر خوشه شامل سویه‌های آفریقایی و سویه یمن بود و زیر خوشه دوم سویه‌های آسیا بودند که خود به دو دسته هند و بنگلادش به همراه سویه عمان و دیگری شامل ترکیه و عراق و قزاقستان بود. همانند تحقیق حاضر، یافته‌های Le Goff و همکاران

با نتایج این پژوهش، مطالعات فیلوژنتیک در برخی از کشورها نشان دهنده عدم تفاوت در سویه‌های در گردش در آن مناطق بوده است (۱). چنانچه، مطالعات انجام یافته در کشور یونان در طول سال‌های ۲۰۱۵ تا ۲۰۱۶ برحسب توالی ژنهای EEV، RPO30، GPCR و LSDV127 هیچ تنوعی در سویه‌های در گردش در این کشور نشان نداد (۱). البته تنها با در نظر گرفتن یک ژن نمی‌توان گفت که جدایه‌های ایران دارای تنوع نیستند و باید مطالعات بیشتری بر اساس ژن‌هایی که در دیگر مناطق تنوع ژنتیکی داشته‌اند، انجام شود.

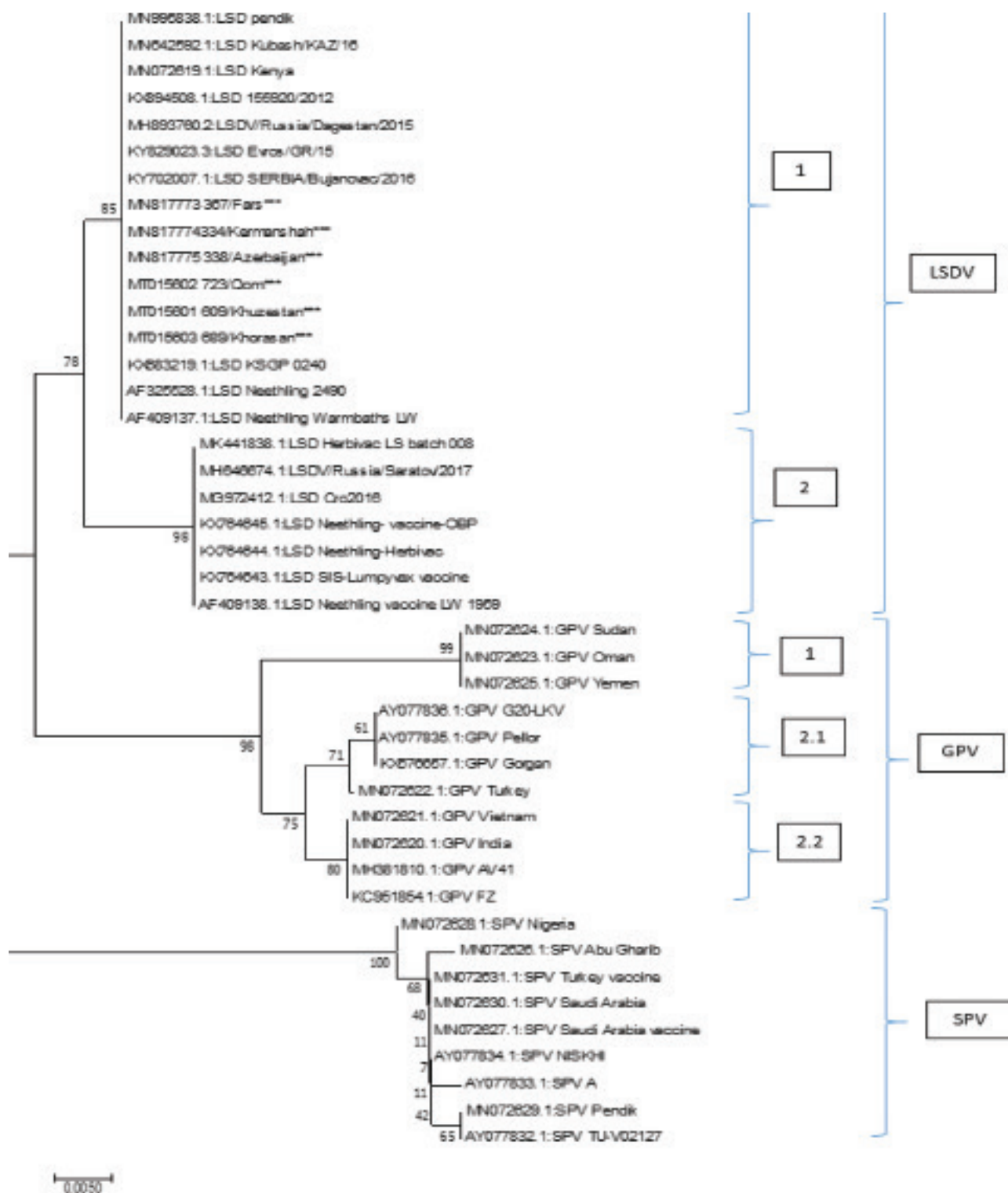
نتایج آنالیز فیلوژنی ژن LSDV142 در خوشه GPV نشان داد که اگر چه این ژن قابلیت تفکیک ویروس‌های واکسینال از غیر واکسینال را در این خوشه نداشت و سویه‌های GPV Gorgan و GPV G20-LKV که سویه واکسینال هستند به همراه سویه حاد GPV Pellor و سویه حاد ترکیه در یک زیر خوشه قرار گرفتند، اما یک الگوی قابل توجه جغرافیایی



شکل ۲- هم‌ریدف‌سازی توالی نوکلئوتیدی ژن LSD142 جدایه‌های LSDV ایران و کاپری پاکستان ویروس‌های انتخابی از بانک ژن

بطور کلی ۲۸ جایگاه متغیر و سه جایگاه حذف سه نوکلئوتیدی در ویروس‌های جنس کپری پاکستان در این ژن دیده شد. دو حذف تنها در سویه‌های واکسینال ویروس بیماری لمپی اسکین و یک حذف در تمامی ویروس‌های بیماری لمپی اسکین دیده شد. این ویروس نسبت به ویروس آبله گوسفندی و آبله بزی به ترتیب دارای ۱۸ و ۱۲ جایگاه متغیر بود. ویروس آبله گوسفندی نسبت به ویروس آبله بزی ۲۳ جایگاه متغیر دارد.





شکل ۳- درخت فیلوژنیک شش جدایه‌های LSD ایران و برخی از جدایه‌های کاپری پاکس و ویروس موجود در بانک ژن بر اساس توالی اسید نوکلئیک ژن LSD142. LSDV نشانگر خوشه ویروس لمپی اسکین، GPV نشانگر خوشه ویروس آبله بزی و SPV نشانگر خوشه ویروس آبله گوسفندی می باشد.

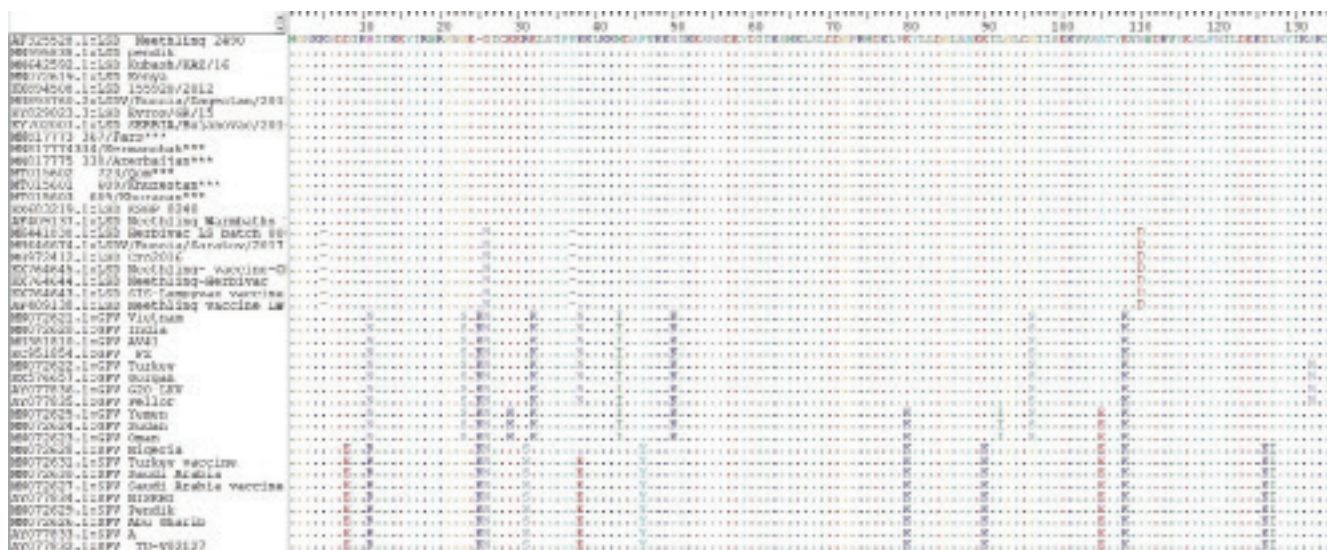
### نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که بین جدایه‌های ویروس LSD در ایران حاصل از مناطق مختلف جغرافیایی، همولوژی ۱۰۰ درصدی وجود داشت. همچنین جدایه‌های مورد مطالعه قرابت کاملی (۱۰۰٪) با ویروس‌های حاد ثبت شده برای این بیماری داشتند. افزون بر این، عامل بیماری LSD در ایران مشابه با عامل این بیماری در کشورهای درگیر در اپیدمی‌های اخیر، ناشی از پروتایپ وابسته به Neethling 2490/1958 می‌باشد. به نظر می‌رسد ژن LSD142 همانند ژن‌های دیگری چون GPCR، RPO30، کاندیدای مناسبی در مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی کاپری پاکس ویروس‌ها باشد، هر چند نیازمند مطالعات بیشتر بخصوص در خوشه‌های GPV و SPV می‌باشد.

### منابع مورد استفاده

1. Agianniotaki EI, Tasioudi KE, Chaintoutis SC, Iliadou P, Mangana-Vougiouka O, Kirtzalidou A, Alexandropoulos T, Sachpatzidis A, Plevraki E, Dovas CI, Chondrokouki E. 2017. Lumpy skin disease outbreaks in Greece during 2015-16, implementation of emergency immunization and genetic differentiation between field isolates and vaccine virus strains. *Veterinary Microbiology* Mar; 201:78-84.
2. Aoyagi, M., Zhai, D., Jin, C., Aleshin, A. E., Stec, B., Reed, J. C.

(۱۷) نیز نشان داد که خوشه SPV دارای زیر خوشه مشخص نبود. از آنجا که این مطالعه بر اساس ژنوم‌های کامل کاپری پاکس ویروس موجود در بانک ژن انجام گرفت، تعداد ویروس‌های مطالعه شده کم بود و امکان بررسی برخی اختلافات با مطالعات قبلی انجام یافته در ژن‌های دیگر وجود نداشت. با این وجود، بنظر می‌رسد در مطالعه فیلوژنتیک کاپری پاکس ویروس‌ها، این ژن عملکردی مشابه ژن GPCR داشته باشد. مقایسه‌ی توالی اسید آمینه ژن LSD142 در این مطالعه، خوشه‌بندی‌های انجام شده بر حسب ترکیب اسید نوکلئوتید را تایید کرد. با وجود ۵ جانشینی و دو حذف سه نوکلئوتیدی در سویه واکسینال LSD، تغییرات اسید آمینه‌ای محدودتر بود و تنها دو حذف تکی و دو جانشینی را در برداشت. در خوشه GPV، سویه‌های آسیای جنوب غربی و آفریقایی نسبت به دو دسته دیگر GPV بیشترین تغییرات داخل خوشه‌ی را دارا بود به طوری که ۵ جانشینی در توالی اسید آمینه نسبت به هر دو دسته دیگر داشت. در حالی که دو دسته دیگر تنها یک جانشینی در توالی اسید آمینه نسبت به یکدیگر داشتند. تغییرات نوکلئوتیدی تکی در سویه‌های نیجریه، عراق و دو سویه ترکیه در خوشه SPV وجود داشت که تنها یک جانشینی در توالی اسید آمینه سویه‌ی نیجریه نسبت به بقیه سویه‌ها ایجاد کرده بود که با سویه‌های GPV آفریقایی در این جایگاه مشابهت داشت. اگرچه قضاوت درباره‌ی تاثیر فتوتیپی حاصل از این تغییرات ژنوتیپی نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد، بنظر می‌رسد آثار فتوتیپی حاصل از این تغییرات در داخل هر خوشه اندک باشد.



شکل ۴- مقایسه‌ی توالی اسید آمینه ژن LSD142 در شش جدایه LSD ایران و کاپری پاکس ویروس‌های انتخابی از بانک ژن

در زیر خوشه لمبی اسکین سویه‌های واکسینال از زیر خوشه سویه‌های حاد با دو جانشینی و دو حذف از هم متفاوت هستند. در زیر خوشه‌های آبله بزی بیشترین جانشینی‌های تکی دیده می‌شود. تمامی سویه‌های خوشه‌های آبله گوسفندی توالی اسید آمینه‌ای یکسانی دارند و تنها سویه نیجریه در جایگاه ۲۸ نسبت به بقیه سویه‌های آبله گوسفندی یک جانشینی دارد.

- & Liddington, R. C. 2007. Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Science* 16, 118–124
3. Babiuk S., Bowden T.R., Boyle D.B. et al. 2008. Capripoxviruses: An Emerging Worldwide Threat to Sheep, Goats and Cattle. *Transboundary and emerging diseases* 55(7), 263-272.
4. Bartlett, N., Symons, J. A., Tscharke, D. C. & Smith, G. L. 2002. The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *Journal of General Virology* 83, 1965–1976.
5. Bedeković, T., Šimić, I., Krešić, N., & Lojkić, I. 2018. Detection of lumpy skin disease virus in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination. *Transboundary and emerging diseases*, 65(2), 491–496.
6. Billings, B & Smith, Scott & Zhang, Z & Lahiri, D & Kotwal, Jignesh. 2005. Lack of N1L Gene Expression Results in a Significant Decrease of Vaccinia Virus Replication in Mouse Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030, 297-302.
7. Biswas, Siddhartha, Ryan S. Noyce, Lorne A. Babiuk, Oliver Lung, Dieter M. Bulach, Timothy R. Bowden, David B. Boyle, Shawn Babiuk, and David H. Evans. (2020). Extended sequencing of vaccine and wild-type capripoxvirus isolates provides insights into genes modulating virulence and host range. *Transboundary and Emerging Diseases*. 67, no. 1: 80-97. 67. 10.1111/tbed.13322.
8. Black D.N, Hammond J.M and Kitching, R.P. 1986. Genomic relationship between capripoxviruses. *Virus Research* 5, Issues 2–3, August, 277-292.
9. Cao JX, Gershon P.D, and Black D.N. 1995. Sequence analysis of HindIII Q2 fragment of capripoxvirus reveals a putative gene encoding a G-protein-coupled chemokine receptor homologue. *Virology*, 209(1):207-212.
10. Cooray, S., Bahar, M. W., Abrescia, N. G., McVey, C. E., Bartlett, N. W Chen, R. A., Stuart, D. I., Grimes, J. M. & Smith, G. L. 2007. Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *Journal of General Virology* 88, 1656–1666.
11. Diperna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Marshall, W. L. 2004. Poxvirus protein N1L targets the I-kB kinase complex, inhibits signaling to NF-kB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *Journal of Biological Chemistry* 279, 36570–36578
12. Erster O, Rubinstein MG, Menasherov S, Ivanova E, Venter E, Šekler M, Kolarevic M, Stram Y . 2019. Importance of the lumpy skin disease virus (LSDV) LSDV126 gene in differential diagnosis and epidemiology and its possible involvement in attenuation. *Archives of Virology*. Sep; 164(9):2285-2295.
13. Gelaye E, Belay A, Ayelet G, Jenberie S, Yami M, Loitsch A, Tuppurainen E, Grabherr R, Diallo A and Lamien C.E. 2015. Capripox disease in Ethiopia: Genetic differences between field isolates and vaccine strain, and implications for vaccination failure. *Antiviral Research* Jul; 119:28-35.
14. Hosamani M, Mondal B, Tembhurne PA, Bandyopadhyay SK, Singh RK, Rasool TJ. 2004. Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR-RFLP of P32 gene. *Virus Genes* 29(1):73-80.
15. Kara PD, Afonso CL, Wallace DB, Kutish GF, Abolnik C, Lu Z, Vreede FT, Taljaard LC, Zsak A, Viljoen GJ, Rock DL. 2003. Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of Lumpy skin disease virus. *Archives of Virology* Jul; 148(7):1335-56.
16. Lamien, C. E., Le Goff, C., Silber, R., Wallace, D. B., Gulyaz, V., Tuppurainen, E., Madani, H., Caufour, P., Adam, T., El Harrak, M., Luckins, A. G., Albina, E., & Diallo, A. 2011 . Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus. *Veterinary Microbiology* 149(1-2):30-39.
17. Le Goff C, Lamien CE, Fakhfakh E, Chadeyras A, Aba-Adulugba E, Libeau G, Tuppurainen E, Wallace DB, Adam T, Silber R, Gulyaz V, Madani H, Caufour P, Hammami S, Diallo A, Albina E. 2009. Capripox virus G-protein-coupled chemokine receptor, a host-range gene suitable for virus-animal origin discrimination. *Journal of General Virology* Aug; 90(Pt 8):1967-1977.
18. Mansour Kh.A (2017). Phylogenetic tree analysis study of Lumpy skin disease virus based envelope protein P32 gene in Al-Qadisiyah province, Iraq. AL-Qadisiyah. *Journal of Veterinary Science* 16, 106-111.
19. Mercier A, Arsevska E, Bournez L, Bronner A, Calavas D, Cauchard J, Falala S, Caufour P, Tisseuil C, Lefrançois T, Lancelot R. 2018. Spread rate of lumpy skin disease in the Balkans, 2015–2016. *Transboundary and emerging diseases* Feb; 65(1):240-243.
20. Ochwo S, VanderWaal K, Ndekezi Ch, Nkamwesiga J, Munsey A, Witto S, Nantima N, Mayanja F, Okurut A, ATUHAIRE D, Mwiine F. 2020 . Molecular detection and phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus from outbreaks in Uganda 2017–2018. *BMC Veterinary Research* 21; 16(1):66.
21. Sevik M., and Dogan M. 2017. Epidemiological and molecular studies on lumpy skin disease outbreaks in Turkey during 2014–2015. *Transboundary and emerging diseases* 64(4):1268-1279.

22. Sprygin A, Babin Y, Peštova Y, Kononova S, Wallace D, Schalkwyk A, Byadovskaya O, Diev V, Lozovoy D, Kononov A. 2018. Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field. *PLOS ONE* 13, e0207480.
23. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. 2001. Genome of lumpy skin disease virus. *Journal of Virology* 75(15):7122-30.
24. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sur JH, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL. 2002. The Genomes of Sheeppox and Goatpox Viruses. *Journal of Virology* 76(12):6054-61.
25. Tuppurainen E.S.M., Oura C.A.L. 2012. Review: Lumpy Skin Disease: An Emerging Threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and Emerging Diseases* 59(1), 40-48.
26. Varshovi. H.R. 2003. Molecular Characterization of Iranian sheep and goat pox viruses by sequence analyses of chemokine receptor homologue gene. PhD thesis. Veterinary Tehran University. Tehran, Iran.

